

Alma Mater Studiorum- Università degli Studi di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MORFOLOGICHE
UMANE E MOLECOLARI**

SETTORE DISCIPLINARE BIO/16

**CITOTOSSICITA' DI SETTE NANOPARTICELLE IN
PROGENITORI EMATOPOIETICI ISOLATI DAL
MIDOLLO OSSO UMANO**

Presentata da: Dott.ssa Lisa Bregoli

Coordinatore:
Chiar.mo Prof.
Lucio Cocco

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa
Lucia Manzoli

Ciclo XXII

Esame finale anno 2010



INDICE

1.INTRODUZIONE	1
1.1 NANOSCIENZA E NANOTECNOLOGIA	2
1.2 NANOMATERIALI	4
1.2.1 Nanomateriali prodotti dalle nanotecnologie	5
1.2.2 Nanomateriali presenti nell'inquinamento ambientale	9
1.3 PROPRIETA' DEI NANOMATERIALI	11
1.3.1 Metodi di valutazione delle proprietà superficiali	13
1.4 APPLICAZIONI DEI NANOMATERIALI	15
1.4.1 Applicazioni biomediche	16
1.5 NANOTOSSICOLOGIA	20
1.5.1 Biocinetica delle nanoparticelle	22
1.5.2 Interazione dei nanomateriali con il sistema reticolo-endoteliale	24
1.5.3 Nanoparticelle e induzione della reazione infiammatoria	24
1.5.4 Tossicità polmonare dei nanomateriali	26
1.5.5 Tossicità cardio-vascolare delle nanoparticelle	28
1.5.6 Tossicità delle nanoparticelle nel sistema nervoso centrale	29
1.6 EMATOPOIESI	31
1.6.1 Saggio di proliferazione e differenziamento dei progenitori ematopoietici (CFU assay)	32
1.7 SCELTA DELLE NANOPARTICELLE E DEL MODELLO CELLULARE	35
1.7.1 La scelta delle nanoparticelle	35
1.7.2 La scelta del modello cellulare	38
2. SCOPO DELLA TESI	40

3. MATERIALI E METODI	42
3.1 CELLULE CD34 ⁺ DA MIDOLLO OSSEO UMANO	43
3.2 NANOPARTICELLE	43
3.3 DINAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)	43
3.4 CFU ASSAY	44
3.5 CULTURA LIQUIDA DELLE CELLULE PROGENITRICI CD34 ⁺ MIDOLLARI	45
3.6 CITOMETRIA A FLUSSO	45
3.7 PCR QUANTITATIVA	46
3.8 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE-TRASMISSIONE (STEM)	46
3.9 CULTURA DELLE LINEE CELLULARI UMANE	46
3.10 GENE EXPRESSION ARRAY	47
3.11 PRECIPITAZIONE DELLE PROTEINE SIERICHE LEGATE ALLE NANOPARTICELLE	47
3.12 ANALISI STATISTICA	48
4. RISULTATI	49
4.1 EFFETTO DI 7 NANOPARTICELLE METALLICHE SULL'ABILITA' DI CELLULE PROGENITRICI EMATOPOIETICHE DI FORMARE COLONIE (CFU assay)	50
4.2 EFFETTO DELLE NANOPARTICELLE DI Sb ₂ O ₃ SULL'ERITROPOIESI	53
4.3 ANALISI DELL'INTERAZIONE TRA Sb ₂ O ₃ E CELLULE PROGENITRICI ERITROIDI	58
4.4 ANALISI DEL SIGNALING	61
4.5 EFFETTO DELLE NANOPARTICELLE DI Sb ₂ O ₃ SU PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DI LINEE CELLULARI	67

4.6 INTERAZIONE DELLE NANOPARTICELLE CON PROTEINE SIERICHE	70
4.7 CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE	72
5. DISCUSSIONE	75
BIBLIOGRAFIA	79

| 1. INTRODUZIONE

1.1 NANOSCIENZA E NANOTECNOLOGIA

Il concetto di nanoscienza fu formulato per la prima volta dal fisico Richard Feynman nel 1959 (Feynman, R. 1960. Engineering and Science, Vol. 23, No. 5, February, pp. 22-36.) nel discorso intitolato *"There's plenty of room at the bottom-An invitation to enter a new field of physics"*, durante il quale ipotizzò che nel futuro si sarebbero potuti costruire dispositivi di varia natura agendo direttamente sulla posizione degli atomi nella materia.

Il termine "nanotecnologia", però, venne coniato soltanto quasi 30 anni più tardi da Kim Eric Drexler, nel suo libro intitolato *"Engines of creation: the coming era of nanotechnology"* del 1986. Sorprendentemente, tutt'ora non esiste una definizione universalmente accettata per nanoscienze e nanotecnologie, ma ve ne sono diverse simili tra loro. Secondo la Royal Society & The Royal Academy of Engineering (UK), *"Nanoscience is the study of phenomena and manipulation of materials at atomic, molecular and macromolecular scales, where properties differ significantly from those at a larger scale"* e, secondo la National Nanotechnology Initiative (NNI) USA, *"Nanotechnology is the understanding and control of matter at dimensions of roughly 1 to 100 nanometers, where unique phenomena enable novel applications... At this level, the physical, chemical, and biological properties of materials differ in fundamental and valuable ways from the properties of individual atoms and molecules or bulk matter"*.

Le **nanoscienze** costituiscono il punto di incontro di discipline diverse che vanno dalla fisica quantistica alla chimica supramolecolare, dalla scienza dei materiali alla biologia molecolare e rappresentano una realtà ormai affermata nel mondo della ricerca. Le **nanotecnologie**, che sono invece ancora nella fase iniziale del loro sviluppo, puntano a sfruttare e ad applicare i metodi e le conoscenze derivanti dalle nanoscienze. Esse fanno riferimento ad un insieme di tecnologie, tecniche e processi che richiedono un approccio multidisciplinare e consentono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni a livello nanometrico. Le prospettive associate alla nanotecnologie derivano dal fatto che, a questi livelli di dimensioni, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente.

Le nanotecnologie trovano applicazione in praticamente tutti i settori produttivi. Numerosi prodotti riconducibili all'utilizzo delle nanotecnologie sono già disponibili sul mercato (Woodrow Wilson Nanotech Inventory) o in procinto di esserlo, ed il loro numero cresce costantemente. Tra essi si possono citare, ad esempio, nanoparticelle per cosmetici, coatings e vernici, tessuti che non si stropicciano e non rilasciano odori, articoli sportivi; ma anche nanocompositi, "hard disks" con superfici nanostrutturate per registrazione dati ad altissima densità, "chips" di memoria con dimensioni inferiori a 100 nm, dispositivi fotonici, superfici autopulenti, sistemi per diagnostica medica basati, per esempio, sul principio "lab-on-chip".

Infine, alcune proprietà delle nanoparticelle, come una aumentata attività chimica, una migliore selettività e l'abilità di attraversare le barriere tissutali, stanno portando allo sviluppo di nuove tecniche in ambito farmacologico. In futuro, una nanoparticella o un gruppo di nanoparticelle potranno essere progettata per cercare, individuare e distruggere una singola cellula patologica. Attraverso le nanotecnologie si potranno stimolare meccanismi di riparazione di tessuti malati o danneggiati, senza ricorrere a trapianti o organi artificiali. Entro i prossimi anni sono attesi, tra altri, sistemi avanzati per la somministrazione mirata di farmaci e protesi mediche più resistenti e con migliorata biocompatibilità.

1.2 NANOMATERIALI

I nanomateriali, per definizione, sono materiali con almeno una dimensione nel range tra 1 e 100 nm. Essi sono prodotti principalmente da due fonti ben distinte: da un lato troviamo i nanomateriali prodotti dalla nanotecnologia che, come detto, applica i principi e metodi definiti dalla nanoscienza. Dall'altro lato, troviamo i nanomateriali presenti nell'ambiente sotto forma di inquinamento, prodotti da ogni forma di combustione come vulcani, incendi, esplosioni, motori a combustione, caldaie per il riscaldamento, centrali elettriche, inceneritori (Tabella 1).

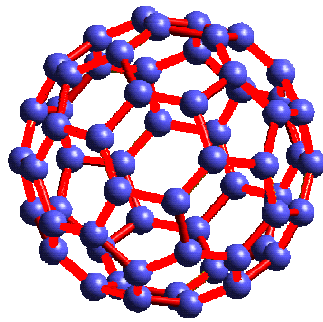
Tabella 1: Principali fonti di nanomateriali

Naturali	Antropogeniche	
	<i>Non intenzionali</i>	<i>Intenzionali</i>
Incendi	Motori a combustione interna	Nanoparticelle ingegnerizzate:
Vulcani	Centrali elettriche	<i>Nanomateriali di carbonio</i>
	Inceneritori	<i>Nanomateriali metallici</i>
	Jet di aeroplani	<i>Dendrimeri</i>
	Fumi metallici (siderurgia)	<i>Compositi</i>
	Fumi polimerici	
	Altri fumi	
	Superfici riscaldate	
	Cottura	
	Motori elettrici	

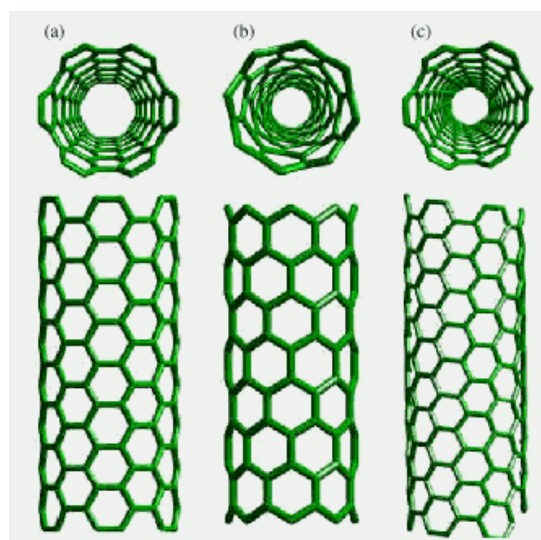
1.2.1 Nanomateriali prodotti dalle nanotecnologie

I nanomateriali più prodotti al giorno d'oggi a livello globale sono quelli di titanio, silicio, alluminio, metalli e carbonio. Esistono diverse classificazione per i nanomateriali prodotti dalle nanotecnologie, che vengono progettati con l'intenzione di migliorare materiali e dispositivi di uso corrente, ed avere un utilizzo in diversi settori come l'elettronica, l'industria tessile, l'edilizia, la sensoristica, l'industria chimica, l'industria automobilistica, la medicina e molti altri. Una classificazione di uso comune divide i nanomateriali in 4 gruppi: i) nanomateriali di carbonio, ii) nanomateriali di metalli, iii) dendrimeri e iv) compositi.

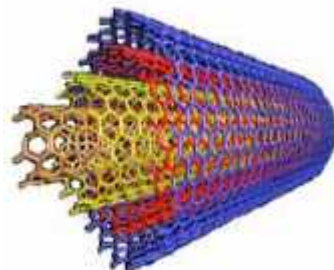
- i) **I nanomateriali di carbonio** sono composti principalmente da carbonio, di solito nella forma di sfere vuote, ellissoidi o tubi. I nanomateriali di carbonio sferici o ellissoidi sono chiamati "fullereni", mentre quelli cilindrici sono detti "nanotubi". Queste particelle hanno diverse applicazioni potenziali, comprese lamine e ricoperture migliorate, materiali più forti e leggeri, ed applicazioni nel campo dell'elettronica. Inoltre, la possibilità di riempire i nanotubi e i fullereni di farmaci, e di funzionalizzare esternamente con peptidi questi nanomateriali, offre la possibilità di progettare sistemi innovativi di trasporto selettivo e controllo di farmaci e marcatori.



Buckyball (Fullerene C₆₀)

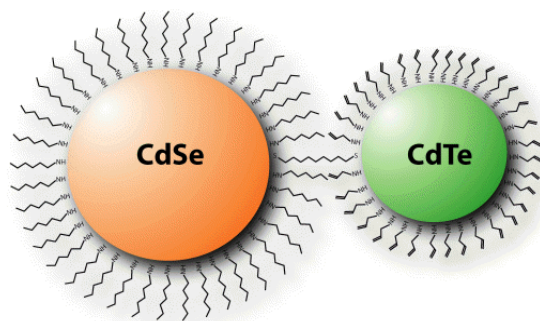


Nanotubi single-wall
a)armchair; b)zig-zag; c)chiral

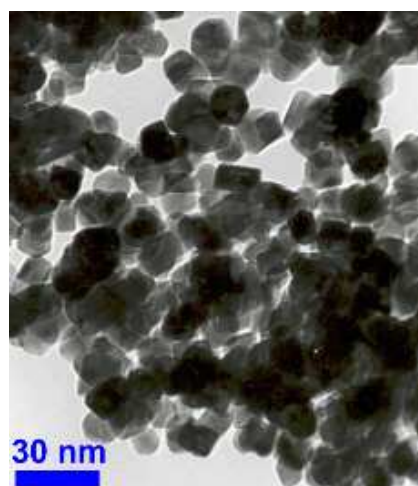


Nanotubi multiple-wall

- ii) I **nanomateriali composti da metalli** includono quantum dots, nanogold, nanosilver e ossidi di metalli come il diossido di titanio (TiO_2). Un quantum dot è un cristallo semiconduttore altamente impaccato di centinaia o migliaia di atomi, e le cui dimensioni sono nell'ordine da alcuni nanometri a alcune centinaia di nanometri. Al variare delle dimensioni dei quantum dots, variano le loro proprietà ottiche, e sono utilizzati per la loro capacità di emettere fluorescenze diverse.

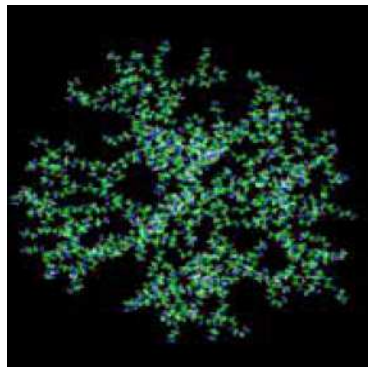


Quantum dots
di diverse dimensioni



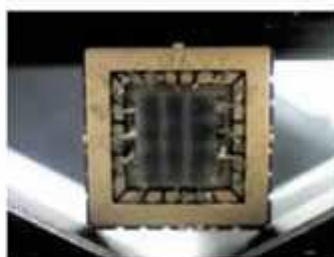
Nanoparticelle di TiO_2 (anatase)

iii) I **dendrimeri** sono polimeri di dimensioni nano, costituiti da unità ramificate. La superficie di un dendrimero ha numerose catene terminali, che possono essere ingegnerizzate per ottenere diverse funzionalità chimiche, per esempio catalisi. Inoltre, poiché dendrimeri tridimensionali contengono cavità interne in cui possono essere incluse altre molecole, possono essere utilizzati per il trasporto selettivo e controllato di farmaci, marcatori e oligonucleotidi. Utilizzando questo sistema di drug delivery, la nanomedicina molecolare rappresenta un grande sfida e promessa per la medicina del futuro.



Dendrimero

iv) Infine, i **compositi** sono ottenuti combinando fra loro solidi di diversa natura e spesso costituiti da una matrice (metallica, polimerica o ceramica) che viene rinforzata con particelle di dimensioni nanometriche. Questa unione permette di ottenere sistemi ibridi con proprietà meccaniche, termiche e elettriche intermedie a quelle dei singoli costituenti e quindi materiali più resistenti, leggeri, poco sensibili alla corrosione, all'usura abrasiva. Vengono utilizzati per esempio per costruire componenti elettroniche, di automobili e materiali per imballaggio.



Apparecchio spintronico
costruito con nanomateriali
compositi

1.2.2 Nanomateriali presenti nell'inquinamento ambientale

I tipi di nanomateriali principalmente presenti nell'inquinamento ambientale sono soprattutto sotto forma di nanoparticelle, ed hanno composizioni chimiche disparate. Le nanoparticelle derivanti da diversi tipi di combustione e termodegradazione sono ritenuti tra i componenti più potenti dell'inquinamento dell'aria, e sono associate ad aumento di morbidità cardiovascolare e morte per ischemia miocardica, aritmia e infarto (32). Infatti, diversi studi epidemiologici hanno dimostrato che l'aumento delle concentrazioni di particolato atmosferico sono legate ad un aumento di morbidità e mortalità a breve termine.

La fonte principale delle nanoparticelle prodotte in modo non intenzionale e presenti nell'inquinamento atmosferico varia a seconda delle regioni e dei fattori ambientali. In genere, nella maggior parte di regioni urbane, le emissioni dei veicoli di trasporto sono la fonte maggiore di particolato nanometrico (10).

Le nanoparticelle presenti nell'atmosfera possono essere classificate come i) primarie e ii) secondarie.

i) Le nanoparticelle **primarie** vengono emesse da fonti naturali (incendi, vulcani, erosione) o antropogeniche (motori a combustione, esplosioni, inceneritori, diversi processi industriali).

ii) Le nanoparticelle **secondarie** si formano nell'aria attraverso conversioni di gas in particelle. Subito dopo la nucleazione, le nanoparticelle sono molto piccole (1-10 nm), e crescono per coagulazione o condensano in particelle sub-micrometriche. La nucleazione omogenea, con la formazione di particelle piccolissime, si può ottenere dalla combustione di gas ad alta temperatura ed in processi metallurgici.

La regolamentazione esistente prevede il controllo e la limitazione dell'emissione nell'atmosfera di particelle di dimensioni inferiori ai 10 micron (PM_{10}) e 2,5 micron ($PM_{2.5}$), ma studi scientifici dimostrano che gli effetti nocivi del particolato atmosferico siano in realtà dovuti maggiormente alla frazione più sottile (<2.5 micron). Inoltre, le nanoparticelle con diametro inferiore ai 100 nanometri ($PM_{0.1}$), anche se in termini di

massa rappresentano la minoranza delle particelle, in termini di numero sono certamente le più abbondanti tra il materiale particolato.

Spesso le particelle ultrafini non si presentano disperse nell'aria, ma come aggregati che ritengono le proprietà tossiche delle singole nanoparticelle. La combustione di gasolio e benzina causa la produzione di un aerosol che è principalmente di dimensioni nano. Due picchi di nanoparticelle sono stati identificati in uno studio sulla composizione delle emissioni da combustione di gasolio: un picco di 30 nm (nanogoccioline, che fungono da nuclei di accumulazione) ed uno di 80 nm. La composizione chimica delle nanogoccioline organiche comprende idrocarburi C_{13} - C_{35} (aldeidi, chetoni, ecc), idrocarburi policiclici aromatici e nitro-idrocarburi policiclici aromatici. I livelli di base delle nanoparticelle ambientali sono nel range tra i 5,000 e 10,000 particelle per centrimetro cubico, valore che può raggiungere i 3,000,000 durante episodi di inquinamento (55).

L'inalazione è la via di esposizione più significativa per le nanoparticelle presenti nell'aria. Le particelle che entrano nell'organismo per questa via possono passare nella circolazione sanguigna nel giro di 1 minuto (35), e raggiungere tutti gli organi interni.

1.3 PROPRIETA' DEI NANOMATERIALI

Le proprietà particolari dei nanomateriali sono dovute al fatto che, per le loro dimensioni, seguono leggi fisiche che si trovano tra la fisica classica e la fisica quantistica. Infatti, il rapporto superficie/volume è molto elevato, a mezza via tra quello degli atomi e quello di materiali di dimensioni oltre il micron. Per esempio, una nanoparticella sferica con un raggio di 2.5 nm e una densità di 5 g/cm^3 ha una superficie di $240 \text{ m}^2/\text{g}$, e ben il 20% degli atomi della particella si trovano sulla superficie (per una review: (4)). E' da considerare, comunque, che le superfici delle nanoparticelle non sono "nude". Infatti, a causa delle forze adesive in superficie, le particelle spesso formano agglomerati, legandosi alla superficie disponibile più vicina. Le caratteristiche che consentono di variare le proprietà dei nanomateriali sono essenzialmente la composizione, la dimensione e la superficie:

-Dimensione: a seconda del materiale utilizzato per produrre le nanoparticelle, variando le dimensioni della nanoparticella si possono modificare proprietà quali solubilità, trasparenza, colore, lunghezza d'onda di assorbimento o emissione, conduttività, punto di fusione e comportamento catalitico.

-Composizione: composizioni chimiche differenti portano a comportamenti fisici e chimici diversi.

-Superficie: differenti proprietà di superficie portano a diversa capacità di dispersione, conduttività, comportamento catalitico e proprietà ottiche. Il legame di peptidi o altre molecole alla superficie di nanomateriali ("funzionalizzazione"), consente di diminuire l'aggregazione, oppure di rendere selettivo il legame con altri materiali o cellule.

Tutti questi parametri devono essere controllati quando si pensa alla all' applicazione tecnica di nanomateriali. Se non è possibile controllare le proprietà di superficie di un nanomateriale, questo forma aggregati, perdendo le caratteristiche che sono proprie della dimensione nanomolecolare.

D'altro canto, sembra che anche gli effetti indesiderati dei nanomateriali siano dovuti a queste stesse caratteristiche che li rendono interessanti, guidate da un'ampia superficie ed elevata reattività superficiale (3).

Molti studi hanno inoltre dimostrato che le modificazioni della carica di superficie influenzano grandemente le risposte biologiche alle nanoparticelle, quali fagocitosi, genotossicità e infiammazione.

1.3.1 Metodi di valutazione delle proprietà superficiali

Siccome le applicazioni tecniche dei nanomateriali dipendono grandemente dalle loro proprietà di superficie, sono stati sviluppati diversi metodi per analizzare le caratteristiche superficiali dei nanomateriali:

-Potenziale zeta: è una funzione della carica di superficie della particella, dello strato adsorbito sulla superficie, della composizione e natura del liquido in cui è sospesa la nanoparticella. Di solito ha lo stesso segno del potenziale alla superficie della particella, ed è misurabile soltanto sperimentalmente. Il potenziale zeta riflette la carica effettiva sulla particella ed è perciò legato alla repulsione elettrostatica. Viene comunemente utilizzato per lo studio di dispersioni di nanoparticelle, e dà una misura della loro aggregazione.

-Secondary ion mass spectroscopy (SIMS): è un metodo distruttivo che dà informazioni sulla composizione atomica degli strati da 1-3 nm con una risoluzione laterale elevata. SIMS ed altri metodi simili, però, possono dare informazioni soltanto sulla composizione elementare di un materiale, e non su proprietà chimiche come la reattività e lo stato di legame degli elementi prossimi alla superficie.

-X-ray photoelectron spectroscopy (ESCA): la spettroscopia elettronica per l'analisi chimica (ESCA) è un metodo non distruttivo utilizzato per misurare la composizione atomica degli strati tra 1-10nm, con scarsa risoluzione laterale. Perciò, è un metodo eccellente per caratterizzare la composizione chimica dei nanomateriali. ESCA, oltre a dare informazioni sulla composizione chimica di un nanomateriale, serve anche per analizzare lo stato di legame di elementi diversi.

-Termogravimetria: le molecole di superficie vengono rimosse dal nanomateriale riscaldandolo lentamente e misurando il cambiamento di peso. In contemporanea, si utilizza la spettroscopia di massa per determinare la natura elementare della molecola che si è staccata dalla superficie. La combinazione delle due tecniche permette di valutare con precisione il legame superficiale a molecole.

-Microscopia a forza atomica (AFM) e scanning tunneling microscopy (STM): queste due tecniche si basano sull'utilizzo di un ago sottilissimo che scansiona una superficie, e

possono essere controllate con una risoluzione inferiore all'atomo. Sono metodi molto potenti per misurare la struttura e topografia di nanomateriali e, in combinazione a microscopia a forza chimica, possono essere utilizzate per identificare singole molecole presenti sulla superficie.

-Reattività superficiale: sono stati sviluppati alcuni metodi più semplici per determinare la reattività superficiale delle nanoparticelle, come la misura dello svolgimento di DNA plasmidico o ossidazione del DNA del timo di vitello (12, 23). La risonanza paramagnetica di elettrone (EPR), in combinazione con lo spin-trap, è stata utilizzata per determinare la capacità di generare radicali. Gli studi di EPR hanno mostrato una associazione positiva tra tossicità in vitro e tossicità in vivo (23, 50, 56). Inoltre, il metodo di EPR ha consentito di dimostrare che i fullereni sono in grado di causare la produzione di radicali di ossigeno (6, 57).

1.4 APPLICAZIONI DEI NANOMATERIALI

I nanomateriali, indipendentemente dalla loro natura (metalli, ceramiche, polimeri, materiali compositi), esibiscono proprietà inaspettate e, a volte, sorprendenti se confrontate con quelle dei materiali convenzionali proprio a causa delle dimensioni dei propri costituenti. Negli ultimi venti anni i nanomateriali sono stati oggetto di intenso studio nei campi più disparati tanto che le moderne nanotecnologie ci mettono oggi a disposizione nanomateriali che possiedono proprietà magnetiche, ottiche, elettriche, meccaniche e catalitiche estremamente migliorate, da un punto di vista tecnologico-applicativo, rispetto a quelle dei materiali convenzionali.

Ad oggi, si contano sul mercato 800 prodotti che provengono dalla nanotecnologia, di cui il 60% sono cosmetici, ed il 10% sono in alimenti e supplementi (52).

Tabella 1:
Proprietà ed applicazioni
dei materiali nanotecnologici

Property	Application
Optical	Anti-reflection coatings. Tailored refractive index of surfaces. Light based sensors for cancer diagnosis .
Magnetic	Increased density storage media. Nanomagnetic particles to create improved detail and contrast in MRI images.
Thermal	Enhance heat transfer from solar collectors to storage tanks. Improve efficiency of coolants in transformers .
Mechanical	Improved wear resistance. New anti-corrosion properties. New structural materials, composites, stronger and lighter.
Electronic	High performance and smaller components, e.g. capacitors for small consumer devices such as mobile phones. Displays that are cheaper, larger, brighter, and more efficient. High conductivity materials.
Energy	High energy density and more durable batteries. Hydrogen storage applications using metal nanoclusters. Electrocatalysts for high efficiency fuel cells. Renewable energy, ultra high performance solar cells. Catalysts for combustion engines to improve efficiency, hence economy.
Biomedical	Antibacterial silver coatings on wound dressings. Sensors for disease detection (quantum dots). Programmed release drug delivery systems. "interactive" food and beverages that change color, flavor or nutrients depending on a diner's taste or health.
Environmental	Clean up of soil contamination and pollution, e.g. oil. Biodegradable polymers. Aids for germination. Treatment of industrial emissions. More efficient and effective water filtration.
Surfaces	Dissolution rates of materials are highly size dependant. Activity of catalysts. Coatings for self cleaning surfaces, Pilkington's glass for example.
Personal care	Effective clear inorganic sunscreens .

1.4.1 Applicazioni biomediche

Negli ultimi anni, molti sforzi sia economici che intellettuali si sono rivolti alle possibili applicazioni dei nanomateriali in ambito biomedico (di qui il termine nanobiomateriali). In particolare, si è notato che l'eccezionale capacità di identificazione delle biomolecole, associata alle singolari proprietà dei nanomateriali possono portare alla creazione di nuovi e migliorati tessuti biologici artificiali, a innovativi dispositivi elettronici basati su strutture biologiche quali i biosensori, a sistemi diagnostici estremamente sofisticati e a nuovi sistemi per la somministrazione di farmaci.

Alcune delle applicazioni dei nanomateriali in medicina sono le seguenti:

- Marcatori biologici fluorescenti
- Drug e gene delivery
- Bio-determinazione di patogeni
- Riconoscimento di proteine
- Sonde per la struttura del DNA
- Ingegnerizzazione di tessuti
- Distruzione di tumori con ipertermia
- Separazione e purificazione di molecole biologiche e cellule
- Miglioramento di liquidi di contrasto per MRI
- Studi di cinetica della fagocitosi

In questo contesto, i nanomateriali possono essere suddivisi in tre categorie principali, a seconda della geometria dei costituenti: a) sferici, b) monodimensionali o fibrosi e c) bidimensionali o lamellari. Una tabella riassuntiva di alcuni tipi di applicazione dei nanomateriali in ambito biomedico, suddivisi per forma geometrica, sono riportati in Tabella 2.

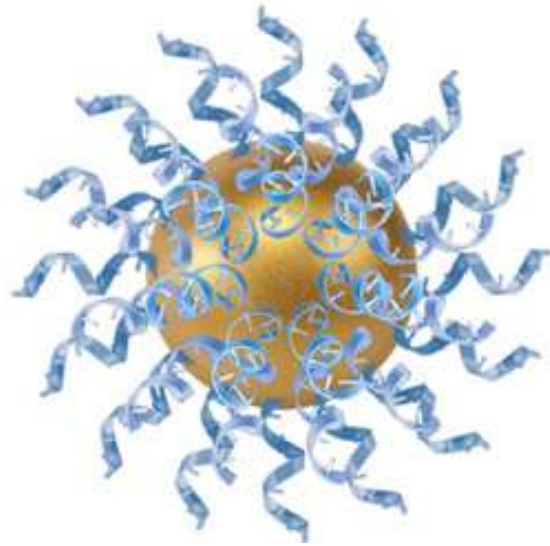
Inoltre, sempre in ambito biomedico, sono attualmente in fase di studio nanoricoprimenti, nanofilm e superfici nanostrutturate realizzate con diverse tecniche di deposizione e

modificazione superficiale. Particolarmente promettente sembra essere il settore dei tessuti e degli impianti artificiali dove i nanomateriali vengono impiegati nella rigenerazione o nella sostituzione di vari tessuti biologici quali ossa, cartilagini, sistemi vascolari e neurali.

Nanomateriali	Applicazioni biomediche
<i>a) sferici</i>	
nanoparticelle di oro	diagnostica e cura dei tumori
nanoparticelle di platino	catalizzatori
nanoparticelle di ossido di titanio	pigmenti, creme solari, ricoprimenti ortopedici
dendrimeri	sistemi per la somministrazione di farmaci
quantum dots	diodi laser, biosensori
<i>b) monodimensionali o fibrosi</i>	
nanotubi e nanofibre di carbonio	conduttori, dispensatori di farmaci
nanofibre di ossido di alluminio	filtri di aria e acqua altamente efficienti
<i>c) bidimensionali o lamellari</i>	
nanoplacche di grafite	rinforzante di polimeri
nano-idrossiapatite	impianti ortopedici e dispensatori di farmaci in ortopedia

Tabella 2: Applicazioni biomediche di nanomateriali, classificati in base alla forma tridimensionale.

Nanoparticelle metalliche possono formare il core del nanomateriale, che viene funzionalizzato in superficie mediante il legame di materiali inorganici o polimerici che rendono selettivo il riconoscimento di molecole o cellule target.



Nanoparticella di Au (13 nm)
funzionaizzata con oligonucleotidi,
farmaci o peptidi

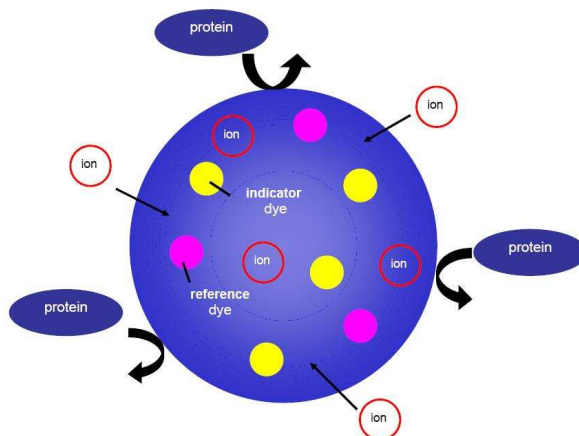
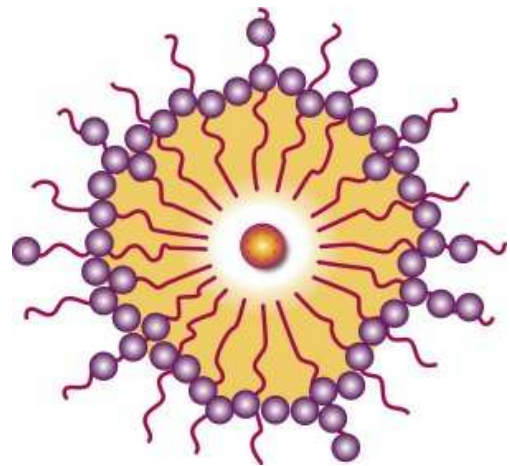
I quantum dots, che trovano applicazione come biomarkers, hanno la caratteristica di assorbire ed emettere luce ad una specifica lunghezza d'onda, a seconda della dimensione della particella.

Quantum dots
di diverse dimensioni



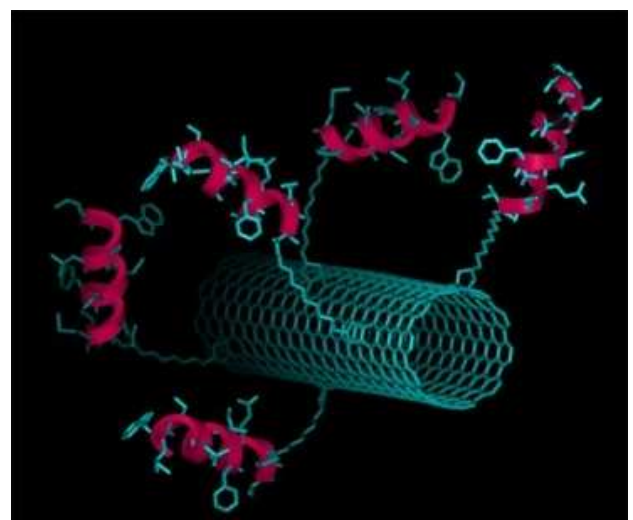
Nanovesicole o nanotubi, invece, sono composti da carbonio e metalli, e formano cavità che possono essere riempiti con farmaci, enzimi o marcatori, e funzionalizzate esternamente con molecole che ne conferiscano la specificità di target. Nanovesicole, nanotubi e nanosensori trovano applicazione in drug delivery, gene delivery, diagnostica e ricerca di base.

Nanocapsula per il trasporto selettivo di DNA, farmaci, marcatori o oligonucleotidi



Nanosensore molecolare

Nanotubo single-wall funzionalizzato con peptidi



1.5 NANOTOSSICOLOGIA

Nonostante le nanotecnologie promettano benefici enormi per la società e grossi capitali siano sempre più investiti in questa nuova tecnologia, e nonostante oggi ci siano circa 800 prodotti nanotecnologici sul mercato (di cui il 60% cosmetici e 10% alimentari), resta ancora da definire se/quali nanomateriali ingegnerizzati sino dannosi per la salute dell'uomo e/o per l'ambiente (52). Non essendo chiari i meccanismi che rendono i nanomateriali così fisicamente e chimicamente unici, è ancora impossibile predire il loro comportamento a contatto con diversi sistemi biologici. Convinzione comune tra i tossicologi è che i nanomateriali, avendo proprietà fisiche e chimiche così diverse dagli stessi materiali nelle dimensioni atomiche o super-micrometriche, abbiano bisogno di essere testati e regolamentati in modo specifico. Nonostante ciò, a tutt'oggi non esistono test standard che siano universalmente riconosciuti per classificare la tossicità di un nanomateriale, e proprio per questo scopo è nata una nuova branca della scienza, nell'incontro tra la nanotecnologia e la tossicologia: la nanotossicologia.

L'impossibilità di definire il rischio legato alla nanotecnologia, dovuto all'assenza di protocolli standard per la valutazione tossicologica dei nanomateriali, rischia di rallentare l'avanzamento della nanotecnologia a causa del principio precauzionale o per paura di investimenti a rischio. In questo scenario, la nanotossicologia si pone come una branca fondamentale per la nanotecnologia.

Da un punto di vista tossicologico, possiamo dividere i nanomateriali provenienti da combustione in modo naturale o non intenzionale, presenti sottoforma di inquinanti ambientali, dai nanomateriali progettati e prodotti dalla nanotecnologia (Tabella 2, paragrafo precedente). Questi due gruppi sono differenti sia dal punto di vista dell'esposizione, che dal punto di vista chimico. L'esposizione a nanomateriali che sono prodotti non intenzionalmente è meno controllabile/prevedibile, rispetto all'esposizioni dei nanomateriali che vengono prodotti dall'industria, ai quali sono esposte classi più ristrette di persone (dal punto di vista di età, sesso, stato di salute), per esempio i lavoratori durante la produzione o il trasporto. Inoltre, da un punto di vista chimico: i nanomateriali presenti nell'inquinamento ambientale sono un insieme chimicamente complesso di natura polidispersa (diversi composti di carbonio volatili solubili, mescolati a

composti inorganici poco solubili), mentre i nanomateriali ingegnerizzati sono soluzioni monodisperse di solidi a composizione chimica conosciuta, generati in gas o fase liquida. Nonostante queste differenze, si suppone che gli stessi principi tossicologici siano applicabili ad entrambe le classi di nanomateriali.

1.5.1 Biocinetica delle nanoparticelle

L'esposizione ai nanomateriali può avvenire attraverso atmosfera, cibo, acqua, prodotti per la cosmesi e dentifrici, contatto con i tessuti di abbigliamento e la somministrazione di farmaci.

In teoria, i nanomateriali presenti nei prodotti cosmetici e dentifrici possono entrare nell'organismo per assorbimento dermico. In pratica, l'assorbimento oltre lo strato della sottomucosa non è ancora stato dimostrato, e nessuno studio è ancora riuscito a dare una risposta al dubbio riguardante l'assorbimento cutaneo di nanoparticelle.

I nanomateriali presenti nell'aria si depositano, per inalazione, lungo tutto il tratto respiratorio (naso, trachea-bronchi, alveoli, a seconda delle dimensioni del particolato). E' stato dimostrato che, per inalazione, le nanoparticelle passano dai polmoni al circolo sanguigno entro un minuto nell'uomo, per andare a depositarsi in diversi organi interni (35). Molti altri studi, condotti su animali, hanno confermato che le nanoparticelle inalate possono raggiungere tutti gli organi interni (26, 42, 51). Inoltre, possono passare attraverso la mucosa nasale ed entrare nel cervello (41). WG Kreyling et al. hanno condotto recentemente uno dei primi studi sistematici di analisi biocinetica delle nanoparticelle, misurando l'accumulo in organi primari e secondari dopo inalazione (25). Dopo instillazione tracheale, gli autori hanno visto una traslocazione sistemica del 10% delle nanoparticelle di ^{192}Ir , ed un accumulo persistente in organi secondari. Hanno inoltre osservato che la traslocazione dipende dal tipo di nanoparticella (^{192}Ir > carbone) e dalle dimensioni (Ir: 20>80 nm; oro: 1.4>18 nm), ma anche dalla carica delle nanoparticelle inalate.

Le nanoparticelle presenti nel cibo (17) e nell'acqua entrano nell'organismo per ingestione. Attraverso l'intestino possono essere eliminate, oppure la parete intestinale le può assorbire e far passare nel circolo sanguigno o linfatico.

Attraverso la via parenterale, i nanomateriali presenti nelle preparazioni di farmaci o biomarker diagnostici, entrano direttamente nella circolazione sanguigna e possono raggiungere ogni organo. La velocità ed il tipo di organo colpito dipende dalle caratteristiche del nanomateriale, e possono essere diversi per diverse nanoparticelle.

Kreying et al. hanno dimostrato che l'uptake da parte del sistema mononucleare fagocitario dipende dalle dimensioni delle nanoparticelle ($200 > 1.4 \text{ nm}$) (reviewed in (52)).

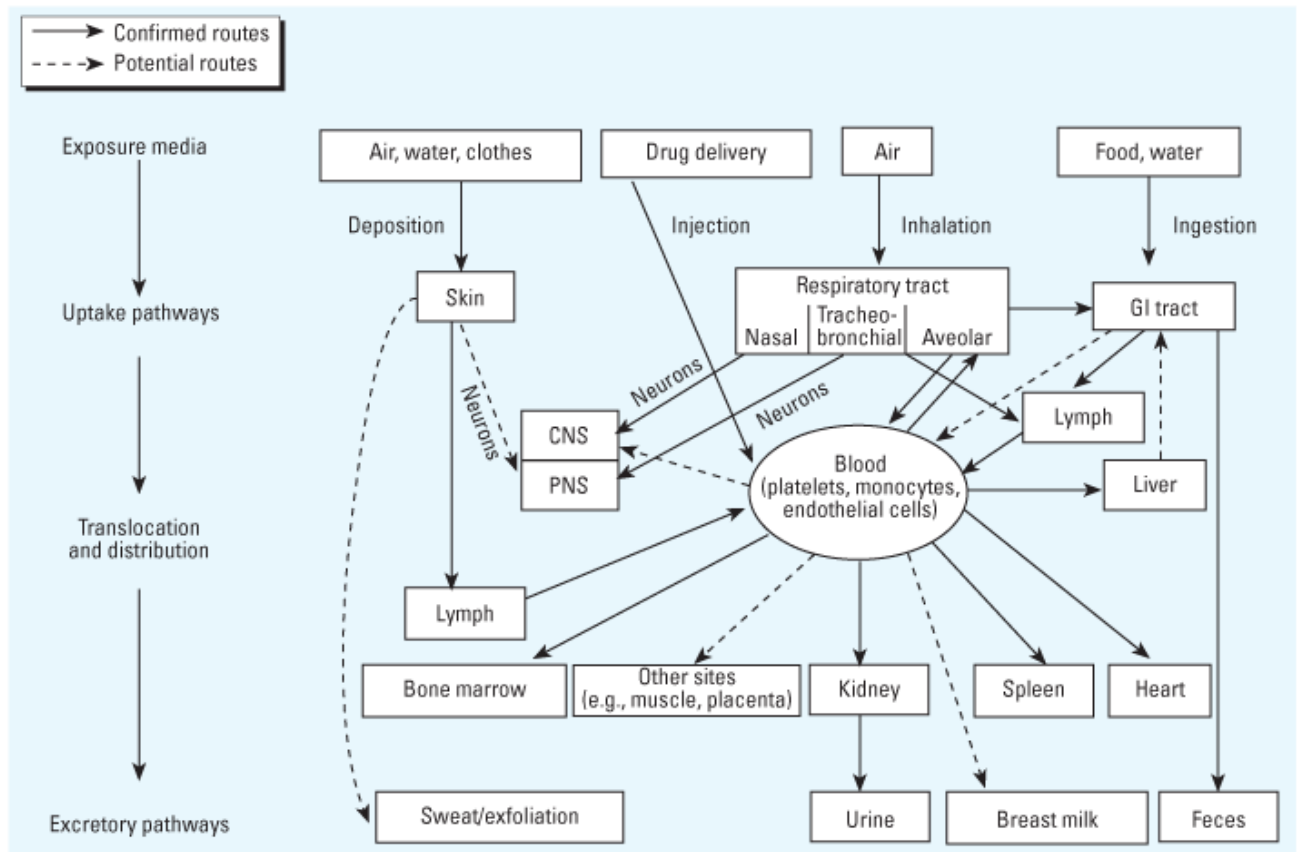


Figura da (40)

Alcuni nanomateriali possono essere eliminati tramite urine, feci, sudore o passare nel latte materno. Le nanoparticelle non solubili, invece, possono accumularsi nei polmoni, intestino e cervello, rene, fegato e rimanere per anni. In questi tessuti, non essendo un attivo uptake da parte dei macrofagi, i nanomateriali interagiscono con cellule dell'epitelio, tessuto interstiziale e cellule endoteliali, scatenando risposte infiammatorie.

1.5.2 Interazione dei nanomateriali con il sistema reticolo-endoteliale

Il sistema reticolo-endoteliale è costituito da cellule in grado di fagocitare debris cellulare, cellule invecchiate, patogeni e sostanze estranee come particelle inerti che circolano nel sangue. Queste cellule comprendono macrofagi, monociti e cellule endoteliali specializzate che ricoprono organi come fegato, milza e midollo osseo. Il sistema reticolo-endoteliale presente nel fegato entra in contatto con tutte le nanoparticelle che vengono assorbite dal tratto gastro-intestinale e, passando attraverso il circolo portale, arrivano al fegato. La funzione principale di questo sistema è di rimuovere e neutralizzare ogni potenziale patogeno che entra in circolazione dopo essere stato assorbito dalla microflora intestinale. Le conseguenze dell'uptake delle nanoparticelle che derivano dall'intestino da parte dei macrofagi non è ancora chiaro. Alcuni studi hanno mostrato che nanoparticelle poco tossiche come carbon black e polistirene sono in grado di stimolare i macrofagi attraverso produzione di radicali liberi e attivazione del signaling del calcio. Il risultato è la produzione di citochine infiammatorie come tumor necrosis factor (7). Lo stress ossidativo, così indotto, può inibire la funzionalità delle cellule epatiche e la formazione della bile (54), mentre le citochine pro-infiammatorie sono associate a malattia epatica.

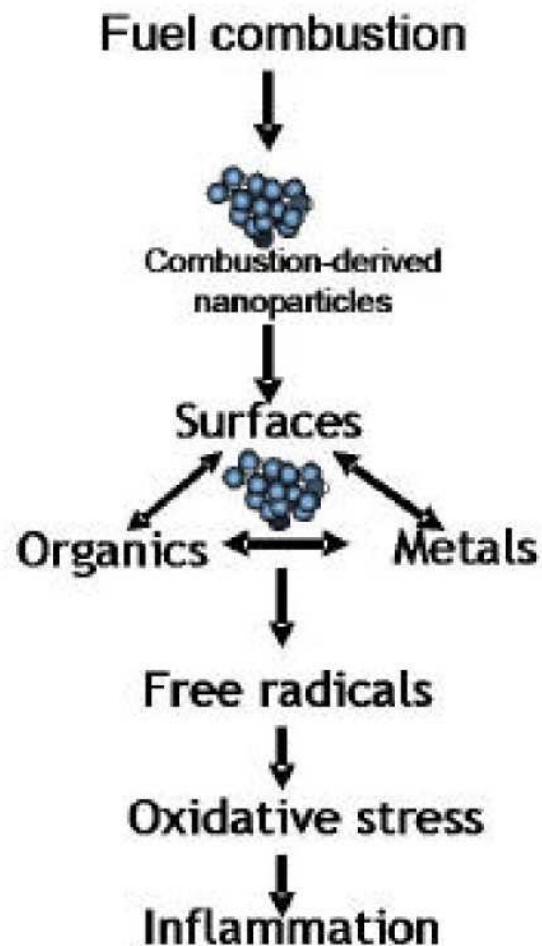
1.5.3 Nanoparticelle e induzione della reazione infiammatoria

Sono stati proposti diversi meccanismi per cui le nanoparticelle causano una risposta infiammatoria. Gli elementi scatenanti sarebbero dovuti alla maggiore area superficiale delle nanoparticelle rispetto a materiali più voluminosi, oppure alla presenza di componenti solubili rilasciati dalle nanoparticelle, come composti organici e metalli (1, 27, 37).

Le sostanze organiche associate al particolato che deriva dalle emissioni di combustione di gasolio sono soprattutto benzene e idrocarburi policiclici aromatici, e causano il rilascio di citochine e fattori di crescita come interleukin-8 (IL-8), IL-1beta, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in colture di cellule epiteliali (2, 21).

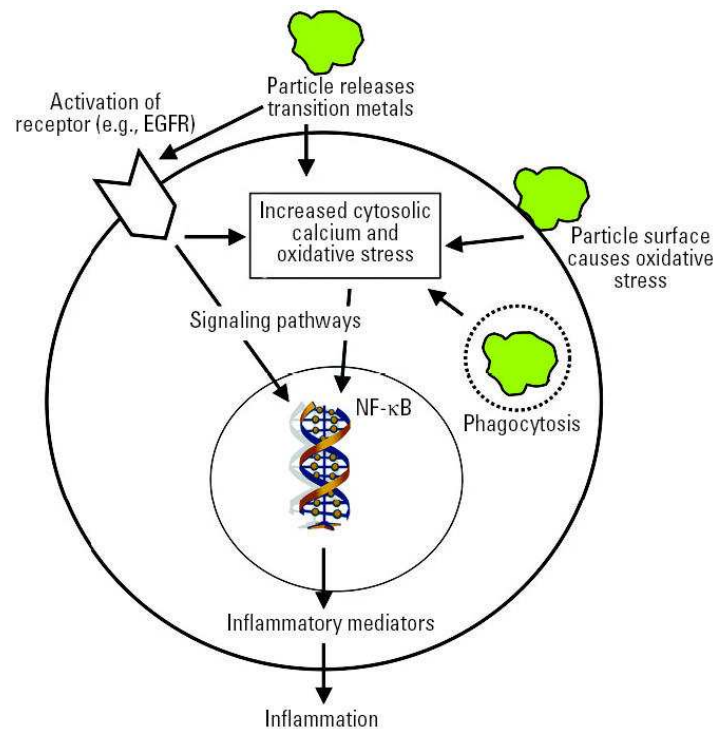
I metalli associati al nanoparticolato atmosferico sono responsabili di stress ossidativo a livello cellulare (11, 53), ed agiscono sinergicamente con la superficie della nanoparticella.

Figura
da (4)



In generale, gli studi hanno identificato cambiamenti nell'espressione genica e nel cell signaling dovuti a stress ossidativo, come principali fattori di tossicità dovuta al contatto con nanoparticelle, e alla presenza di metalli di transizione e composti organici associati a nanoparticelle atmosferiche. Gli effetti erano di solito più amplificati per le nanoparticelle rispetto a particelle fini, anche se per il particolato atmosferico, a volte era vero il

contrario. L'interpretazione di studi in vitro è a volte resa difficile dal fatto che vengano utilizzate particelle di composizione chimica differente, oppure diversi tipi cellulari, diverse esposizioni e dosi.



Modello di interazione tra cellula e nanoparticella da (40).

1.5.4 Tossicità polmonare dei nanomateriali

Studi di tossicità sui ratti hanno dimostrato che le nanoparticelle causano risposte infiammatorie più accentuate rispetto a particelle della stessa composizione chimica ma di volume maggiore (13, 39). Sia l'area superficiale che il numero di particelle inalate sembrano giocare un ruolo importante nella tossicità polmonare. Un ulteriore elemento di tossicità delle nanoparticelle sta nella velocità di deposizione che dipende dalla dimensione del particolato, che è maggiore nel caso di particelle disperse piuttosto che aggregate. Gli studi citati suggeriscono come le nanoparticelle inalate, dopo essersi

depositate nel polmone, eludono il controllo dei macrofagi alveolari e riescono ad infiltrarsi nello spazio interstiziale, mediante traslocazione dagli spazi alveolari attraverso l'epitelio (4).

I fattori che si pensa influenzino maggiormente la tossicità polmonare dei nanomateriali sono:

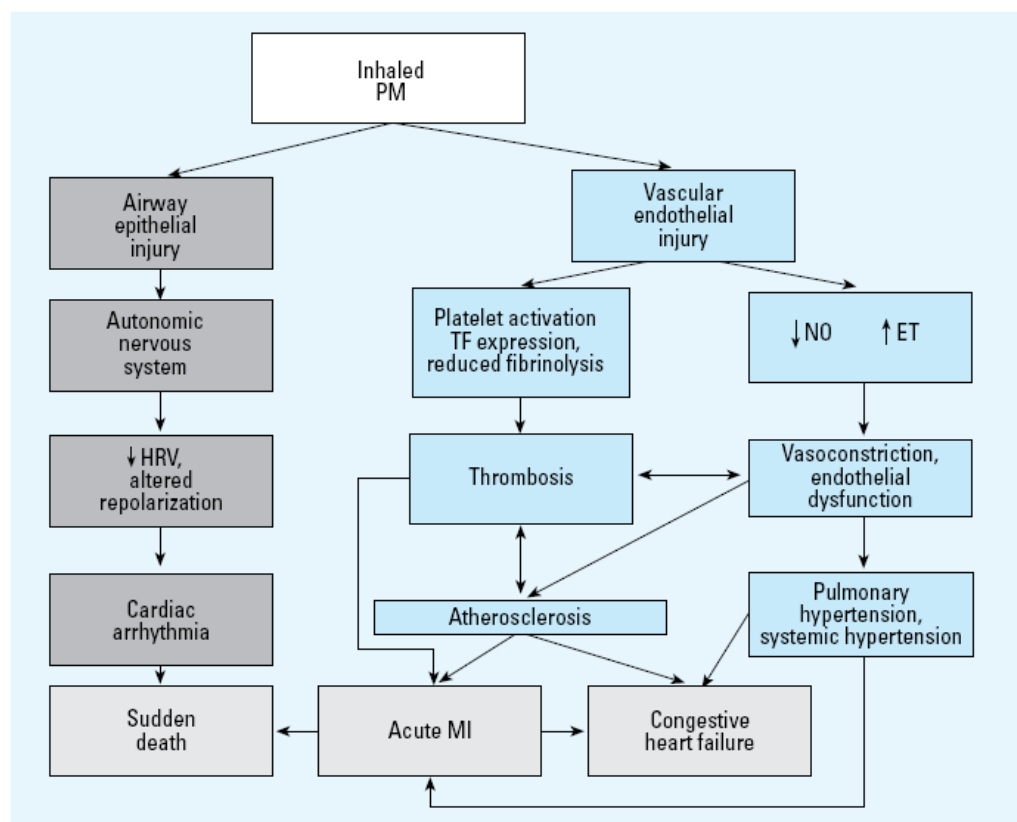
- 1) numero e dimensioni delle nanoparticelle
- 2) coating superficiale
- 3) grado di aggregazione/agglomerazione
- 4) cariche superficiali
- 5) metodo di sintesi

In teoria, le nanoparticelle aggregate possono anche disgregarsi, a contatto con liquidi particolari. Il grado di aggregazione o disgregazione delle nanoparticelle al momento dell'inalazione, o nelle fasi di deposizione nel tratto respiratorio, influisce grandemente sulle interazioni con le cellule polmonari. Infatti, se le aggregati nanoparticelle si disgregano durante l'interazione con i fluidi alveolari, possono comportarsi come nanoparticelle singole e traslocare agli organi interni.

Studi di tossicologia su nanoparticelle fibrose hanno dimostrato che fibre naturali (come l'amianto) e costruite dall'uomo sono associate a elevato rischio di fibrosi e cancro polmonare (19). I parametri critici sono: dose, dimensione e durabilità delle fibre. Le fibre sono, per definizione, di struttura allungata con un rapporto diametro:lunghezza (*aspect ratio*) di 3:1 o maggiore, e con una lunghezza maggiore a 5 micrometri e diametro inferiore ai 3 micrometri. I nanotubi di carbonio hanno un *aspect ratio* maggiore di 100, e la lunghezza può eccedere i 5 micrometri con diametri da 0.7 a 1,5 nm per nanotubi a singola parete (singel-walled nanotubes), e da 2 a 50 per i nanotubi a pareti multiple (multiwalled nanotubes).

1.5.5 Tossicità cardio-vascolare delle nanoparticelle

La maggior parte dei dati sulla tossicità delle nanoparticelle derivano da studi sui PM₁₀, da cui si sono formulate ipotesi che vengono applicate a tutti i nanomateriali. Studi epidemiologici sugli effetti cardiovascolari della porzione ultrafine del particolato ambientale hanno portato alla formulazione di ipotesi sui meccanismi del danno che provoca infarto miocardico (43, 44, 59) o mortalità (16, 31, 47, 59, 61), come descritto in Figura (14).



Meccanismi di tossicità delle nanoparticelle ambientali inalate (PM) sull'apparato cardio-circolatorio. ET: endotelio, MI: infarto miocardico, NO: ossido nitrico, TF: fattore tissutale. Da (14).

Secondo una ipotesi che è stata formulata recentemente, un fattore importante alla base del danno cardiovascolare sarebbe attribuibile alla risposta infiammatoria che si scatena al contatto con le particelle ultrafini ambientali. L'infiammazione polmonare causerebbe

un rilascio di radicali liberi, citochine e chemochine nella circolazione sanguigna (15), che agiscono negativamente sulla funzionalità cardiaca. Infatti, in pazienti affetti da malattia coronarica ed esposti a diverse frazioni del particolato ambientale, è stato visto un aumento di proteina C reattiva ed un'aumentata coagulazione del sangue (49). In conclusione, si pensa che la frazione particolata dell'inquinamento atmosferico sia un fattore di rischio di mortalità per malattia cardio-vascolare attraverso meccanismi di infiammazione, arterosclerosi accelerata e funzione autonoma accelerata (48, 60).

1.5.6 Tossicità delle nanoparticelle nel sistema nervoso centrale

Le nanoparticelle inalate possono accedere al sistema nervoso centrale (CNS) (26, 51), per contatto con l'epitelio nasale e risalendo per trasporto trans-sinaptico dei nervi olfattivi fino al bulbo olfattivo (41).

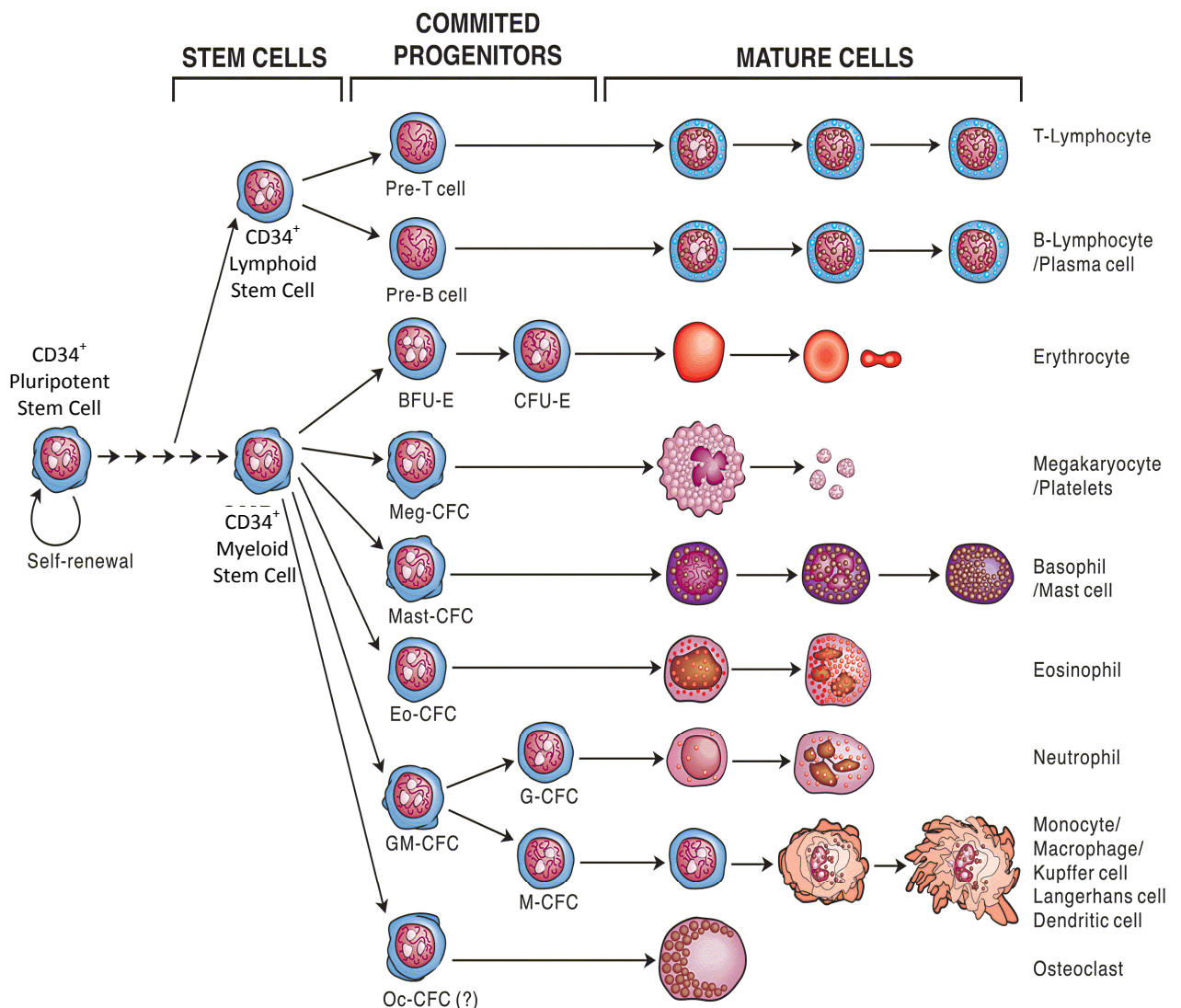
Inoltre, i nanomateriali che circolano nel sangue possono entrare nel CNS attraverso il superamento della barriera emato-encefalica. Nonostante questa sia una barriera altamente selettiva, e consenta il passaggio soltanto per via trans-cellulare, in molte patologie, come ipertensione ed encefalomyelitis allergica, la permeabilità della barriera emato-encefalica risulta diminuita e fa passare nanoparticelle, come dimostrato in alcuni modelli. E' stato inoltre dimostrato che la carica superficiale delle nanoparticelle può alterare l'integrità della barriera ematoencefalica, con possibili conseguenze sugli impegni dei nanomateriali per drug delivery nel CNS (24, 33), ma anche sulla tossicità nel cervello (28).

L'utilizzo di nanoparticelle paramagnetiche di magnetite (ossido di ferro Fe_3O_4) si è dimostrato sperimentalmente interessante (20), e si pensa che potrà essere applicato ai trapianti, per seguire il destino delle cellule staminali introdotte per curare malattie degenerative. La tossicità di un utilizzo del genere, però. Rimane ancora del tutto sconosciuto. Non si sa ancora pressochè nulla, infatti, sulla tossicologia dei nanomateriali nel cervello. E' stato dimostrato che le nanoparticelle inducono stress ossidativo, e proprio lo stress ossidativo è uno dei fattori implicati in malattie neurodegenerative come Parkinson's disease e Alzheimer's disease (22). Uno studio del 2004 ha suggerito

un'associazione tra nanoparticelle presenti nel cervello e l'aumento dei marker dell'infiammazione e accumulazione di AB42 nella corteccia frontale ed ippocampo di persone che avevano sviluppato malattia di Alzheimer (8). Infine, in topi è stata mostrata un'attivazione delle citochine pro-infiammatorie nel cervello in seguito ad inalazione di particolato (9).

1.6 EMATOPOIESI

L'emopoiesi, ovvero la formazione di tutte le cellule del sangue, avviene nel midollo osseo partendo dalle cellule staminali (stem cells) ematopoietiche residenti, che esprimono sulla loro superficie la proteina di *cluster differentiation* CD34⁺. Queste cellule CD34⁺ si trovano in uno stato quiescente e pronte, in seguito a particolari stimoli, a duplicarsi (self-renewal) oppure ad entrare nella via differenziativa verso una delle linee ematopoietiche.



Quando la cellula staminale ematopoietica riceve un segnale di differenziamento, essa può diventare un progenitore linfoide oppure un progenitore mieloide. Dal progenitore linfoide, in risposta a specifici segnali differenziativi e proliferativi, si generano i precursori di tutti i linfociti, sia di tipo B che T. Questi poi entrano nel sangue e vanno a proliferare e maturare in organi linfoidi secondari, come linfonodi, timo e milza. I progenitori mieloidi, invece, danno origine a eritrociti, granulociti (eosinofili, basofili, neutrofili), monociti-macrofagi e trombociti.

1.6.1 Saggio di proliferazione e differenziamento dei progenitori ematopoietici (CFU assay)

Una CFU (colony forming unit), o CFC (colony forming cell), è una cellula in grado di replicarsi e differenziarsi, dando origine ad una intera colonia di cellule. La scoperta che le cellule precursori ematopoietici hanno la capacità di formare colonie risale a più di 40 anni fa (5, 46), ed ha rivoluzionato l'ematologia da un punto di vista sperimentale, diagnostico e terapeutico. Da allora, la conoscenza dei meccanismi di proliferazione e differenziamento dei precursori ematopoietici ha fatto passi da gigante. Questa scoperta ha permesso di delineare meccanismi di fisiologia e patologia dello sviluppo di queste cellule, portando all'utilizzo di citochine ematopoietiche nella pratica clinica e sperimentale. Inoltre, sono stati sviluppati metodi per stimare il numero di cellule progenitrici, da una sospensione di cellule miste (per esempio sangue o aspirato midollare).

Il saggio di proliferazione e differenziamento delle CFU (CFU assay) riproduce gli ultimi stadi dell'ematopoiesi mieloide in coltura a breve termine, e richiede 14 giorni di coltura in terreno semisolido. Per studiare gli stadi primitivi dell'ematopoiesi sono invece necessarie colture a lungo termine (almeno 7 settimane), divise in 2 o 3 diversi passaggi, e richiedono almeno un passaggio di incubazione su un *feeder layer* di cellule di supporto. Le cellule staminali pluripotenti, infine, possono essere testate soltanto in modelli animali, in cui queste cellule sono in grado di ripopolare un midollo osseo precedentemente ablato.

I precursori che formano colonie in 14 giorni rappresentano uno stadio intermedio tra cellule staminali pluripotenti in grado di ripopolare un midollo osseo e cellule con caratteristiche morfologiche di differenziamento. Il destino differenziativo (*line commitment*) di queste cellule può essere determinato *in vitro* mediante il CFU Assay, che consente ad ogni singolo progenitore mieloide di crescere e dare luogo ad una colonia, con il supporto di un terreno contenente una matrice semisolida (metilcellulosa, collagene o agar). Ogni colonia, in base alle caratteristiche morfologiche della colonia stessa o delle cellule che la compongono, può essere identificata come derivante da un progenitore eritroide (BFU-E o CFU-E), granulocitico (CFU-G), monocitico (CFU-M) o megacariocitico (CFU-Meg). Si possono inoltre sviluppare colonie miste (CFU-GEMM, CFU-GM).

I precursori delle diverse linee differenziali hanno bisogno della presenza di diversi fattori di crescita, che vengono aggiunti al terreno all'inizio della coltura. I fattori di crescita più utilizzati sono:

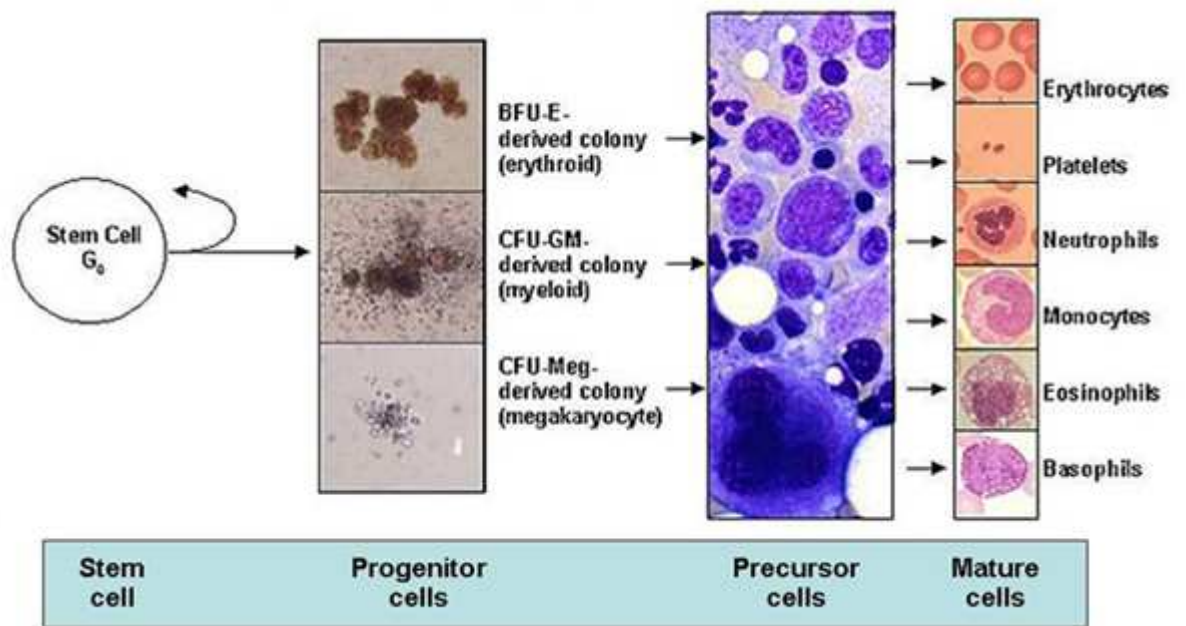
-Eritropoietina: Epo è indispensabile per la sintesi dell'emoglobina in vivo ed in vitro.

-Stem Cell Factor: SCF ha una forte azione stimolante, non fisiologica. Spinge verso il differenziamento eritroide, a discapito della linea neutrofila, probabilmente a causa dei suoi effetti antiapoptotici sui precursori eritroidi, e stimola eosinofili e basofili.

-Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor: GM-CSF ha un'azione stimolante per diverse linee: CFU-M, CFU-Eo (precursori eosinofili), BFU-E (burst forming unit-erythroid) in terreno contenente Epo e crescita di macrofagi singoli parsi. E' uno stimolatore debole di CFU-G.

-Granulocyte Colony-Stimulating factor: G-CSF, nonostante il nome, non stimola molto i CFU-G, ma soprattutto agisce sui BFU-E in terreno contenente Epo.

-Interleuchina-3: IL-3 stimola CFU-M, CFU-Eo e soprattutto BFU-E in terreno contenente Epo. Stimola debolmente CFU-G.



1.7 SCELTA DELLE NANOPARTICELLE E DEL MODELLO CELLULARE

1.7.1 *La scelta delle nanoparticelle*

Le nanoparticelle che abbiamo deciso di testare hanno un interesse nel settore della nanotossicologia ambientale e della nanotecnologia. Infatti, le nanoparticelle di TiO_2 , Au, Ag e Fe_3O_4 , Fe_2O_3 vengono prodotte dalla nanotecnologia e sono già presenti in commercio in diversi prodotti, mentre quelle di Sb_2O_3 , e Co sono presenti nell'ambiente come prodotti di degradazione ed inquinanti.

-nanoparticelle di TiO_2 : Il diossido di titanio è molto resistente, leggero, resistente alla corrosione anche in condizioni chimiche drastiche, ha un'elevata attività fotocatalitica ed un costo relativamente basso. Viene usato principalmente come pigmento bianco nelle vernici, nelle materie plastiche e nel cemento da costruzione e come opacizzante per le vernici colorate; per tale ragione, viene anche comunemente "bianco di titanio". Esso ha sostituito i pigmenti usati precedentemente, quali il bianco di piombo, il solfato di bario e il solfato di calcio. E' usato anche come carica nelle materie plastiche e nella gomma, come opacizzante nella carta e nelle fibre tessili e nei materiali ceramici per aumentare la resistenza agli acidi. Il TiO_2 viene utilizzato in medicina per costruire protesi articolari, da cui per usura vengono rilasciate nanoparticelle di questo materiale. Si stanno inoltre studiando materiali avvolti da una pellicola di TiO_2 nanoporosa per aumentare l'adesione di cellule nelle protesi dentali. Inoltre, le nanoparticelle di titanio vengono usate in prodotti per alimenti e in cosmetici, soprattutto nelle lozioni solari per le proprietà di filtri UV. E' classificato come non tossico, ma sono stati riportati effetti infiammatori a livello polmonare quando nanostrutture di rutilio (TiO_2) vengono instillati nella trachea di ratti (36).

-nanoparticelle di Au: Le nanoparticelle d'oro vengono prodotte con facilità ed in condizioni blande per riduzione chimica di Sali di oro. Le dimensioni in questo caso possono essere molto ridotte (anche inferiori al nanometro) e le dispersioni molto piccole. Le nanoparticelle d'oro possiedono, come altri tipi di particelle metalliche, particolari proprietà di assorbimento della luce visibile (assorbimento plasmonico) che le rendono particolarmente adatte allo sviluppo di test diagnostici, alcuni dei quali già

commercializzati. Un'altra importante caratteristica è la possibilità di assemblare sulla loro superficie un monostrato ordinato di molecole organiche dotate di gruppi funzionali tiolici: questa proprietà potrà consentire lo sviluppo di diverse applicazioni sia nel campo della catalisi che del trasporto di farmaci. Infine, nanoparticelle d'oro sono presenti in alcuni prodotti cosmetici e lubrificanti.

-nanoparticelle di Ag: accanto alle nanoparticelle d'oro, anche le nanoparticelle di argento, del tutto simili per modalità di preparazione e proprietà, stanno attraendo una notevole attenzione per le loro proprietà antibatteriche e sono presenti in molti prodotti di origine diversa, come per esempio tessuti per abbigliamento sportivo.

-nanoparticelle di Fe_3O_4 : le nanoparticelle di magnetite possono essere preparate con facilità per riduzione chimica di sali di ferro e sono molto studiate per le particolari proprietà magnetiche, che le rendono estremamente interessanti per le applicazioni di tipo biomedicale. Esse infatti possono essere "spostate" con campi magnetici esterni e questo rende possibile sia il loro recupero (ad esempio per isolare determinati composti da matrici complesse a scopo diagnostico) che il loro direccionamento (per concentrare le particelle nel tessuto biologico di interesse). Questo tipo di particelle sono oggetto di grande attenzione anche come agenti di contrasto per la risonanza magnetica nucleare e per il trattamento terapeutico con la tecnica dell'ipertermia. In questo caso, l'esposizione del tessuto biologico contenente le particelle ad un campo magnetico oscillante provoca il riscaldamento del tessuto e quindi la morte delle cellule che lo costituiscono. Allo stato attuale, non sono ancora disponibili prodotti commerciali per questo tipo di nanosistemi. Un'ulteriore applicazione delle nanoparticelle di Fe_3O_4 è nella pulizia delle acque contaminate da arsenico (58). Il meccanismo è mostrato nella figura successiva.



Nanoparticella di Fe_3O_4 (in rosso) con attaccate delle molecole di acido oleico che legano molecole di arsenico (in verde-blu). Le nanoparticelle, così cariche di arsenio, possono poi essere eliminate dalla soluzione con l'utilizzo di un piccolo magnete, trascinando via l'arsenico.

-nanoparticelle di Fe_2O_3 : L'applicazione potenziale di nanoparticelle di ematite è soprattutto nella diagnostica medica. Per esempio, potrebbero essere utilizzate come agente di contrasto per risonanza magnetica e terapia tumorale con la tecnica dell'ipertermia indotta da campo magnetico. Il problema delle nanoparticelle di ematite, al momento, è la loro tendenza fortissima a formare aggregati, e si stanno sviluppando sistemi per rendere queste nanoparticelle più dispersibili in soluzioni acquose.

-nanoparticelle di Sb_2O_3 : l'ossido di antimonio è utilizzato come catalizzatore per la formazione di plastiche e per le proprietà ignifughe. Si trova in molti prodotti di uso comune, comprese bottiglie di plastica, computers, freni delle macchine. Nell'ambiente, nanoparticelle di Sb_2O_3 si trovano sottoforma di inquinanti, che escono dai camini degli inceneritori e vengono prodotti dall'usura dei freni dei veicoli stradali. Inclusioni di dimensioni nanometriche-micrometriche sono state ritrovate in biopsie di tessuti umani colpiti da patologie di eziologia sconosciuta (non pubblicato).

-nanoparticelle di Co: Le nanoparticelle di cobalto, come quelle di magnetite e di ematite, sono interessanti in nanotecnologia per le loro proprietà magnetiche, ed hanno potenziale utilizzo in medicina, come agenti di contrasto e terapia tumorale mediante ipertermia. Ultimamente le nanoparticelle di Co sono risultate interessanti come migliore alternativa a quelle di ferro, a causa di migliori proprietà fisiche. Nanoparticelle di cobalto, inoltre, si trovano negli scarichi di inceneritori e si formano in seguito ad esplosioni ad alta temperatura, per esempio durante operazioni belliche. Queste sono state trovate in tessuti patologici di persone affette da malattie ad eziologia sconosciuta (non pubblicato).

1.7.2 La scelta del modello cellulare

Quando le nanoparticelle incontrano il corpo umano, esse entrano in contatto immediatamente con i tessuti che formano la barriera con l'esterno, cioè epidermide, tessuto polmonare e tessuti dell'apparato gastro-intestinale, attraverso le vie che abbiamo descritto nei capitoli precedenti. Una volta entrate, interagiscono con il sangue e con le cellule che sono presenti nel sangue. I modelli di studio fin'ora sviluppati, per determinare la tossicità delle nanoparticelle a contatto con i tessuti biologici, si sono concentrati soprattutto sulle cellule del polmone o cellule epiteliali, mentre ancora poco è stato fatto con cellule del sangue.

Esistono molte linee cellulari continue che derivano da cellule del sangue umano, la maggior parte delle quali derivano da tumori. In tutti i casi, si tratta di cellule che hanno perso gran parte delle caratteristiche fenotipiche rispetto alle cellule sane da cui sono originariamente partite. Oltre ad essere state selezionate per la loro capacità di crescita virtualmente illimitata, esse vengono utilizzate in condizioni di laboratorio per anni, hanno attraversato diverse selezioni ed accumulato errori genomici ad ogni passaggio. Per questi motivi, nonostante le linee cellulari continue restino uno strumento indispensabile per la biologia e la medicina, non bisogna dimenticare che la risposta di queste cellule ad uno stimolo tossico può essere totalmente diversa dalla risposta che una cellula *in vivo* può dare allo stesso stimolo.

Le colture di cellule primarie, seppur mantenendo i limiti dati dall'artificialità della coltura *in vitro*, è probabilmente un modello migliore per predire la tossicità di materiali come le nanoparticelle, e vengono sempre più scelte come sistema biologico dai laboratori di tossicologia. Le colture primarie vengono prodotte coltivando cellule prelevate da organi espunti di animali, oppure da biopsie umane da donatori, e mantenute in coltura per un periodo di poche settimane, limitando l'accumulo di aberrazioni.

Per questo lavoro abbiamo scelto di creare colture primarie da cellule staminali/progenitrici di midollo osseo umano. Questo modello ha una rilevanza in quanto, quando le nanoparticelle entrano nel sistema circolatorio, esse incontrano le cellule del sangue e possono esercitare un effetto tossico sia sulle cellule mature, che sui progenitori circolanti. Inoltre, le nanoparticelle possono entrare nel midollo osseo dove le cellule progenitrici e staminali sono concentrate, ed avere effetti tossici a più lungo termine sulla funzionalità delle cellule del sangue.

Le cellule staminali/progenitrici che abbiamo utilizzato sono state acquistate dalla Stem Cell Technologies, che le ha ottenute tramite aspirazione di midollo osseo da donatori sani informati, in accordo con le linee guida etiche Americane.



2. SCOPO DELLA TESI

Nonostante le nanotecnologie promettano benefici enormi per la società e grossi capitali siano sempre più investiti in questa nuova tecnologia, e nonostante oggi ci siano circa 800 prodotti nanotecnologici sul mercato (di cui il 60% cosmetici e 10% alimentari), resta ancora da definire se/quali nanomateriali ingegnerizzati o presenti nell'ambiente sottoforma di inquinamento siano dannosi per la salute dell'uomo e/o per l'ambiente. Alcuni meccanismi e principi di tossicità sono stati ipotizzati utilizzando nanoparticelle e nanofibre, ma è ancora impossibile predire il loro comportamento a contatto con diversi sistemi biologici. Convinzione comune tra i tossicologi è che i nanomateriali, avendo proprietà fisiche e chimiche così diverse dagli stessi materiali nelle dimensioni atomiche o super-micrometriche, abbiano bisogno di essere testati e regolamentati in modo specifico. Nonostante ciò, a tutt'oggi non esistono test standard che siano universalmente riconosciuti per classificare la tossicità di un nanomateriale.

Lo scopo di questo lavoro è stato di definire la tossicità di alcune nanoparticelle che si trovano nell'ambiente sottoforma di inquinanti (Co, Sb₂O₃, Fe₂O₃) oppure in prodotti nanotecnologici (es. TiO₂, Ag, Au, Fe₃O₄), in un sistema che, seppur con le limitazioni della coltura *in vitro*, potesse avvicinarsi il più possibile alla cellula umana in condizioni simili a quelle fisiologiche. Alcuni effetti tossici di nanomateriali su cellule sono già stati dimostrati *in vitro*, ma si tratta per lo più di studi compiuti su linee cellulari diverse ed i risultati non sono spesso paragonabili. Le linee cellulari potrebbero non essere il modello migliore in cui testare la nanotossicologia, in quanto sono costituite da cellule tumorali o trasformate, che si replicano continuamente *in vitro*. Questa continua replicazione, oltre a produrre errori genomici che si sommano ad ogni passaggio di coltura, è dovuta al fatto che i meccanismi fondamentali della proliferazione e del differenziamento sono profondamente alterati in queste cellule. In primo luogo, quindi, ci siamo posti il problema del modello cellulare in cui testare la tossicità delle nanoparticelle. Abbiamo scelto di utilizzare cellule progenitrici ematopoietiche, estratte dal midollo osseo di donatori sani. Abbiamo poi paragonato i risultati ottenuti in queste cellule, a risultati ottenuti in linee cellulari.

Il secondo scopo del presente lavoro è stato di fornire i primi elementi per un'analisi di meccanismi cellulari e di signaling della nanotossicità delle nanoparticelle di Sb₂O₃.



3. MATERIALI E METODI

3.1 CELLULE CD34⁺ DA MIDOLLO OSSEO UMANO

Le cellule progenitrici CD34⁺ di midollo osseo da 9 donatori sani sono stati acquistate dalla Stem Cell Technologies. Ogni campione conteneva cellule derivanti da un solo donatore, ed i 9 campioni provenivano da 9 donatori diversi. I campioni di midollo osseo venivano processati dalla Stem Cell Technologies, che provvedeva ad estrarre le CD34⁺ mediante selezione positiva. Ogni campione era provvisto di un certificato di qualità, attestante la purezza del preparato (almeno il 95% delle cellule erano CD34⁺). Le cellule ci sono arrivate congelate, trasportate in ghiaccio secco e conservate in azoto liquido.

3.2 NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle di ossido di ferro (Fe_3O_4 , diametro: 20-30 nm), ossido di ferro (Fe_2O_3 , diametro: 55-65 nm), argento (Ag, diametro 90-210 nm), oro (Au, diametro: 50-100 nm), ossido di antimonio (Sb_2O_3 , diametro: 41-91 nm) sono state acquistate da Nanoamor. Le nanoparticelle di cobalto (Co, diametro 50-200 nm) sono state acquistate da Fluka Chemical Corp. Le nanoparticelle di ossido di titanio (TiO_2 , diametro: 20-160 nm) sono state acquistate da TAL Materials, Inc. Le nanoparticelle sono state pesate e depirogenate a 189°C per 90 minuti in tubi di vetro. Le nanoparticelle secche così sterilizzate sono state risospese aggiungendo lentamente terreno di coltura e immediatamente agitate e sonicate a bagno per 15 minuti. Agitazione e sonicazione sono state ripetute prima di ogni utilizzo dello stock risospeso.

3.3 DINAMIC LIGHT SCATTERING (DLS)

La caratterizzazione delle dispersioni di nanoparticelle in soluzione è stata ottenuta con la tecnica del photon correlation spectroscopy, utilizzando un Zetasizer 3000 (Malvern Instruments). Le nanoparticelle secche sono state rispesse in diversi terreni di coltura che erano utilizzati nei diversi esperimenti. Il terreno semi-solido contenente metilcellulosa non rendeva possibile una lettura attendibile con questo strumento, ed è stato sostituito con Iscove Modified Dulbecco Medium (IMDM) con l'aggiunta di siero bovino fetale (FBS)

al 30%. I campioni sono stati misurati 10 volte, e le misurazioni sono state fatte a 25°C con un angolo di 90°. I dati sono stati analizzati con il software Contin e sono mostrati come funzione dell'intensità.

3.4 CFU ASSAY

Le cellule progenitrici CD34⁺ derivanti del midollo osseo e le cellule delle linee K562 e HL-60 sono state piastrate alla concentrazione di 500 cellule/ml in un terreno contenente metilcellulosa (Metho-Cult, Stem Cell Technologies Inc., cataloghi numero H4535 e H4434) secondo procedure standard (38). Il terreno era composto da IMDM supplementato con FBS al 30%, albumina serica bovina al 1%, 10⁻⁴ betamercaptoetanol, 2mM L-glutamina e diverse combinazioni di fattori di crescita. Per il saggio delle colony forming unit-granulociti (CFU-G), -macrofagi (CFU-M), -granulociti/monociti (CFU-GM) e -eosinofili (CFU-Eo) e per le cellule della linea HL-60, il terreno H4535 conteneva 50ng/ml stem cell factor (SCF), 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml G-CSF, 20 ng/ml interleuchina-3 (IL-3) e 20 ng/ml IL-6. Per il saggio CFU dei progenitori eritroidi (BFU-E) e le cellule della linea K562, il terreno (H4434) conteneva 50 ng/ml SCF, 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml G-CSF, 20 ng/ml interleuchina-3 (IL-3) e 3U/ml eritropoietina (Epo). Nonostante i progenitori CFU-G, CFU-M, CFU-G; e CFU-Eo sviluppino coonie anche nel terreno H4434, abbiamo deciso di testare questi progenitori in terreno H4535 perché è più completo per i precursori granulociti-monociti. Al momento della piastratura, le nanoparticelle sono state aggiunte alle concentrazioni indicate. Per minimizzare l'errore, ogni concentrazione è stata testata in duplicato o triplicato, e un controllo negativo in duplicato o triplicato per ogni donatore era sempre presente. Le piastre sono state incubate per 14 giorni a 37°C in 90% umidità e 5% CO₂. La conta delle colonie è stata effettuata con un microscopio ad una magnificazione di 40X, seguendo procedure standard (38). L'effetto tossico delle nanoparticelle è stato determinato in funzione del numero di colonie cresciute in terreno contenente le nanoparticelle, confrontato con il numero di colonie in terreno controllo. Per analisi successive, le colonie sono state estratte dalla coltura di metilcellulosa, risospese in IMDM e lavate in PBS.

3.5 COLTURA LIQUIDA DELLE CELLULE PROGENITRICI CD34⁺ MIDOLLARI

L'espansione dei progenitori CD34⁺ provenienti dal midollo osseo è stata realizzata seguendo il primo passaggio di un protocollo a tre passaggi pubblicato da Giarratana et al. (18), con piccole modifiche. In breve, le fasi di proliferazione cellulare e le prime fasi del differenziamento sono stati indotti in un terreno senza siero (Iscoe Modified Dulbecco Medium, IMDM) con l'aggiunta di 4mM glutammina, 50 U/ml penicillina, 50 microg/ml streptomycin, 1% BSA, 120 microg/ml transferrina umana, 900 ng/ml solfato di ferro, 90 ng/nitrato di ferro, 10 microg/ml insulina umana ricombinante, 10⁻⁶ M idrocortisone, 100 ng/ml stem cell factor (SCF), 5 ng/ml interleuchina-3 (IL-3) e 1U/ml Epo. La concentrazione di cellule era compresa tra 2x10⁴ a 1.4x10⁶ ml⁻¹. Per indurre il differenziamento, abbiamo seguito un diverso protocollo precedente pubblicato da Migliaccio et al (30). In breve, le cellule sono state estratte dal terreno di crescita, lavate con IMDM e messe in coltura ad una concentrazione tra 1.8x10⁵ a 5x10⁵ cells/ml in IMDM in presenza di 20% FCS, 1U/ml Epo 2 10ng/ml insulina ricombinante umana. Le cellule vive sono state contate con un emocitometro, in presenza di trypan blue per l'esclusione di cellule morte.

3.6 CITOMETRIA A FLUSSO

Il profilo antigenico delle cellule è stato analizzato con citometria a flusso, con un EPICS XL flow cytometer (Beckam Coulter), seguendo procedure standard. Le cellule sono state lavate in soluzione salina tamponata (PBS), incubate per 1 ora con PBS con l'aggiunta di FCS 1% ed anticorpo anti-CD71 di topo marcato con fluoresceina isotiocianato (FITC) (Beckam Coulter). Una seconda aliquota di cellule è stata incubata con il corrispondente controllo isotipo, per escludere la fluorescenza non specifica. Il pattern di espressione di CD71 nel presente lavoro è risultato simile ai dati pubblicati da Migliaccio et al (30). Il CD71 non è espresso nelle cellule progenitrici CD34⁺, altamente espresso nei progenitori eritroidi proliferanti e il livello di espressione scende nelle cellule differenziate.

3.7 PCR QUANTITATIVA

L'RNA totale è stato estratto dai campioni cellulari mediante l'utilizzo di un kit commerciale (RNeasy Mini Kit della Qiagen), seguendo le indicazioni del produttore del kit. La quantificazione del contenuto totale di RNA è stata determinata con NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific). Una quantità di RNA totale pari a 0.5-1.5 µg è stata retrotrascritta con M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), utilizzando oligodT come primers e seguendo le istruzioni del produttore dell'enzima. La PCR quantitativa è stata eseguita utilizzando il Taqman Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), seguendo le istruzioni del produttore. Le sonde e primers sono stati comprati da Applied Biosystem, nel Gene Expression Assay specifico per ogni gene. La PCR quantitativa è stata eseguita con il sistema 7300 real-Time PCR System (Applied Biosystems).

3.8 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE-TRASMISSIONE (STEM)

I pellet cellulari sono stati fissati in 0.1 M tampone fosfato e 2% glutaraldeide, post-fissati in 0.1 M tampone fosfato con 1% OsO₄, disidratati con acetone ed inclusi in resina epon con il kit commerciale Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma), seguendo istruzioni del produttore. Sezioni ultrafini sono state tagliate con lam di diamante e posate su griglie di rame (TAAB Laboratoires Equipment Ltd.) ed analizzate con un microscopio elettronico Field Emission Gun-Environmental Scanning Electron Microscope (Quanta 200, FEI Company, The Netherlands) in modalità STEM, equipaggiato con un sistema di energy dispersive spectroscopy (EDS) con EDAX (Ametek), per l'analisi chimica delle nanoparticelle incluse nei campioni cellulari.

3.9 COLTURA DELLE LINEE CELLULARI UMANE

Le linee cellulari CEM, CEM-R (CEM VBL100, drug-resistant), Jurkat, Molt-4, HL-60, K562 e Thp-1 sono state messe in coltura a 0.3×10^6 cellule/ml in terreno RPMI 1640 con l'aggiunta di 10% FCS, 4mM glutamina, 50 U/ml penicillina e 50 µg/ml streptomicina. La coltura della linea variante multidrug resistant delle CEM (CEM-R) è

stata supplementata con 100ng/ml vinblastina ogni settimana, per mantenere la selezione (29). Il terreno di differenziamento è stato preparato aggiungendo 1% dimetilsolfossido (DMSO), 50 microg/ml emina o 100 mircoM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) al terreno di crescita. Le cellule vive sono state contate con un emocitometro, in presenza di trypan blue per l'esclusione di cellule morte. Siccome le cellule della linea Thp-1 durante il differenziamento in presenza di PMA si attaccano al fondo della piastra di coltura, per contarle sono state lavate in PBS e trattate con tripsina. Le fotografie delle colture cellulari sono state scattate ad un microscopio dotato di CCD camera (Olympus).

3.10 GENE EXPRESSION ARRAY

Le cellule CD34+ del midollo osseo umano sono state coltivate per 8 giorni in terreno proliferativo, come descritto nel paragrafo 3.5. Al giorno 8 di coltura, i campioni cellulari sono stati divisi in 2 campioni uguali. Ad uno abbiamo aggiunto le NP di Sb₂O₃ a 5 microg/ml, mentre l'altro campione è stato usato come controllo non trattato. Dopo ulteriori 6 ore di coltura, le cellule sono state raccolte e lavate. L'RNA è stato estratto utilizzando il kit della Qiagen Rnaseasy, seguendo le istruzioni del produttore. Utilizzando poi il kit commerciale della SABiosciences (RT2 profiler PCR assay system, Pathfinder), l'RNA è stato trascritto in cDNA, e l'espressione di 84 geni è stata analizzata con PCR quantitativa, seguendo scrupolosamente le indicazioni del produttore del kit.

3.11 PRECIPITAZIONE DELLE PROTEINE SIERICHE LEGATE ALLE NANOPARTICELLE

0,5 ml di siero umano per campione è stato de-complementato a 56°C per 20 minuti e filtrato con filtro da 0,22 micrometri. 0,5 ml di PBS sono stati aggiunti, in cui era disciolto un cocktail di inibitori delle proteasi. Una stessa quantità di PBS inibitore dell proteasi è stato aggiunto e disciolto. Le nanoparticelle sono state aggiunte a 12,5 microgrammi/ml, mentre nessuna nanoparticella è stata aggiunta nel controllo. I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 4 ore in costante agitazione (rotamixer), dopodichè sono stati fatti centrifugare a 5,000x5 per 10 minutia 20 °C. Il pellet è stato lavato 3 volte,

centrifugando a 3,000xg per 5 minuti a 20°C in PBS, RIPA buffer oppure un ImmunoPrecipitation Wash Buffer, composto da 100mM Tris pH7.4, 1% NP40, 250 mM saccarosio, protease inhibitors (Roche). Il pellet è stato infine risospeso in 25 microlitri di Laemli buffer, bollito per 5 minuti, e “caricato” su un gel di elettroforesi al 8% oppure 12% di acrilammide. La colorazione del gel, avvenuta alla fine della corsa elettroforetica del gel, è stata eseguita seguendo protocolli standard con Comassie Blue.

3.12 ANALISI STATISTICA

Ogni esperimento è stato eseguito almeno in duplicato, come indicato nelle legende delle figure. I risultati sono espressi come media \pm Standard Deviation di esperimenti separati (in numero n , indicato in ogni legenda). I dati in figura 1 sono stati analizzati statisticamente applicando il t-test, mediante l'utilizzo del programma SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc.). $p < 0.05$ è stato considerato come indice di differenza significativa tra due gruppi di dati.

| 4. RISULTATI

4.1 EFFETTO DI 7 NANOPARTICELLE METALLICHE SULL'ABILITA' DI CELLULE PROGENITRICI EMATOPOIETICHE DI FORMARE COLONIE (CFU assay)

Abbiamo testato l'effetto delle 7 nanoparticelle metalliche (Au, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₂O₃, Ag, Co e Sb₂O₃) sulla crescita e differenziamento delle cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs) CD34⁺ del midolo osseo umano, mediante il saggio della formazione di colonie detto "CFU assay". 500 cellule/ml sono state piastrate in pozzetti di piastre da 6, in terreno semisolido contenente metilcellulosa e tutti i fattori di crescita necessari per lo sviluppo di colonie bianche (dai progenitori CD34⁺ granulocitici-monocitici CFU-G/CFU-M/CFU-GM/CFU-Eo) o rosse (dai progenitori CD34⁺ eritroidi BFU-E). Durante la piastratura, le nanoparticelle (NP) sono state aggiunte alla concentrazione nominale di 5, 25 e 100 microg/ml (ppm). La **Figura 4.1** mostra il numero di colonie al giorno 14, espresso come relativo alle piastre controllo (senza l'aggiunta delle NP). Le NP di Au, TiO₂, Fe₂O₃, Fe₃O₄ e Ag non hanno avuto effetti sulla formazione delle colonie bianche (**Fig 4.1a, sinistra**) ne' sulle colonie rosse (**Fig 4.1a, destra**).

Le NP di Co hanno avuto un effetto tossico su entrambi i tipi di colonie (bianche e rosse): alle concentrazioni maggiori (25 e 100 ppm) la formazione delle colonie era del tutto inibita, mentre a 5 ppm le colonie sono cresciute solo del 25% rispetto al controllo (**Fig 4.1b e c**). L'osservazione della tossicità delle NP di Co, che abbiamo visto che sulle linee continue K562 e CEM (non mostrato), è compatibile con uno studio condotto su cellule endoteliali umane, ed è probabilmente dovuta agli ioni di Co che vengono rilasciati dalle NP (45).

Anche le NP di Sb₂O₃ hanno esercitato un effetto tossico alle concentrazioni maggiori (25 e 100 ppm), sia sui progenitori delle colonie bianche che su quelli delle colonie rosse. Invece, alla concentrazione più bassa abbiamo osservato un interessante effetto specifico: a 5 ppm le NP di Sb₂O₃ non avevano nessun effetto sulle colonie bianche, mentre inibivano completamente la formazione delle colonie rosse (**Fig 4.1b e c**).

La curva dose-risposta (**Fig 4.2**) ha mostrato che già a 2.5 ppm le NP di Sb₂O₃ hanno un effetto tossico sui progenitori eritroidi, permettendo solo la crescita del 75% delle colonie.

E' da notare, comunque, che le colonie eritroidi cresciute in presenza di NP di Sb_2O_3 alla concentrazione di 2.5 ppm sono morfologicamente alterate, ovvero più piccole e scure.

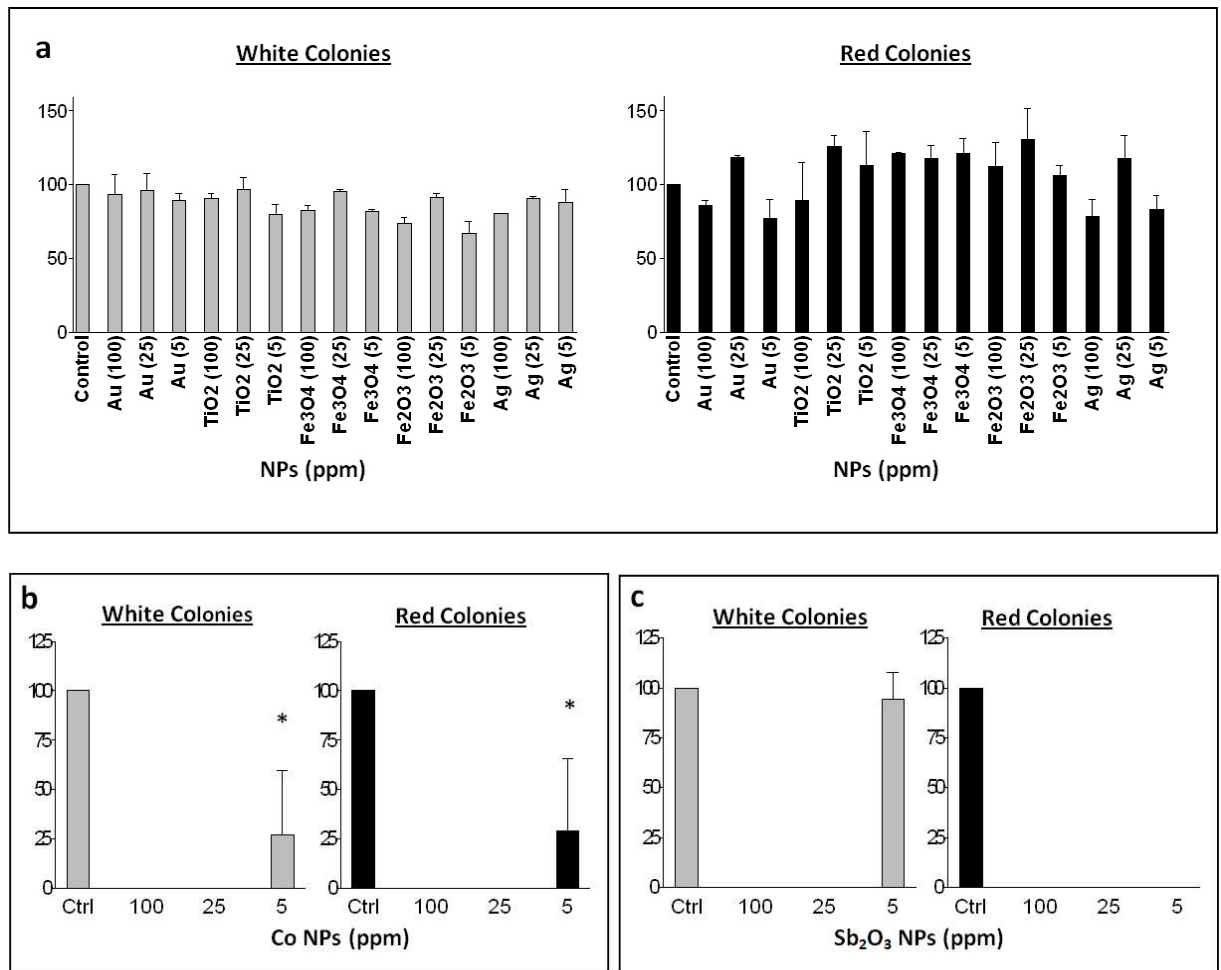


Figura 4.1 Saggio di sviluppo delle colonie (CFU assay) dei progenitori granulocitici-monocitici (white colonies: CFU-G/CFU-M/CFU-GM/CFU-Eo) ed eritroidi (red colonies: BFU-E) in presenza delle NP. Asse Y: numero di colonie al giorno 14 di coltura, espresso come percentuale rispetto al controllo non trattato. (a) Le NP indicate sotto all'asse X sono state aggiunte alle concentrazioni in parentesi (ppm), $n=2$ ognuno in duplicato. (b,c) NP di Co o Sb_2O_3 sono state aggiunte alle concentrazioni indicate. L'asterisco (*) indica differenza significativa ($p < 0.05$). $n=4$ per Co e $n=5$ per Sb_2O_3 , ognuno in duplicato o triplicato. La barra degli errori rappresenta la deviazione standard. Per NP di Sb_2O_3 alla concentrazione di 5 ppm, $n=9$. Ciascun n deriva da donatori diversi.

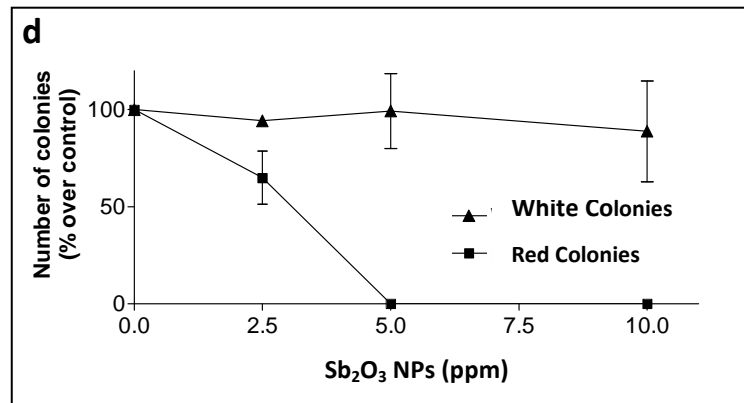


Figura 4.2 Curva dose-risposta, CFU assay dei progenitori eritroidi midollari (red colonies, quadratini neri) o progenitori granulocitici-monocitici midollari (white colonies, triangolini neri), in presenza di diverse concentrazioni di NP di Sb₂O₃.

In conclusione di questi due primi esperimenti, possiamo dedurre che le NP di Au, TiO₂, Fe₂O₃, Fe₃O₄ e Ag non hanno mostrato di esercitare alcun effetto tossico, in relazione alla capacità di progenitori eritroidi e granulocitici-monocitici di formare colonie. Le NP di Co, invece, sono risultate tossiche a tutte le concentrazioni, infatti a 100 e 25 ppm la formazione delle colonie era totalmente inibita, mentre a 5 ppm il numero di colonie era solo il 25% rispetto al controllo. Le NP di Sb₂O₃, infine, hanno mostrato l'effetto più interessante: nonostante a 100 e 25 ppm queste NP inibissero totalmente la formazione di colonie bianche e rosse, a 5 ppm le NP di Sb₂O₃ esercitano un effetto tossico soltanto sulle cellule progenitrici eritroidi, essendo innocue invece ai progenitori granulocitici-monocitici.

4.2 EFFETTO DELLE NANOPARTICELLE DI Sb_2O_3 SULL'ERITROPOIESI

In seguito alle osservazioni precedentemente illustrate, abbiamo ritenuto interessante approfondire il meccanismo di tossicità delle NP di Sb_2O_3 sulle cellule eritroidi. In primo luogo, ci siamo chiesti se questo effetto tossico avesse luogo durante la fase di proliferazione o durante la fase di differenziamento dello sviluppo eritroide. Ci siamo cioè chiesti se l'effetto tossico fosse sulla cellula progenitrice CD34^+ che inizialmente prolifera, oppure se la tossicità si manifestasse più avanti, quando la cellula smette di proliferare ed inizia a differenziare. Nella coltura semisolida del CFU assay, l'evento di proliferazione e quello di differenziamento non sono distinguibili, in quanto non è possibile sincronizzare le cellule. Dopo 7 giorni dalla piastratura delle cellule si iniziano a vedere le prime colonie ancora piccole, in cui alcune cellule stanno ancora proliferando ed altre stanno differenziando. Abbiamo quindi cercato di creare un sistema *in vitro* che ci permettesse di distinguere le due fasi di proliferazione e differenziamento, in modo da poter aggiungere le NP di Sb_2O_3 in ciascuna delle due fasi ed osservare l'effetto. Dopo aver provato diversi protocolli per l'espansione eritroide delle cellule progenitrici CD34^+ provenienti dal midollo osseo umano, abbiamo scelto di combinare due protocolli diversi, entrambi pubblicati.

Per la fase di proliferazione (expansion phase), abbiamo seguito la prima parte di un protocollo diviso in 3 fasi, messo a punto dal laboratorio del professor Douay (18). Per l'analisi della fase differenziativa, abbiamo seguito il protocollo messo a punto nel laboratorio del prof. Migliaccio (30).

Come controllo della rilevanza di questo modello, abbiamo eseguito un'analisi fenotipica, sia a livello di marcatori proteici che a livello di espressione genica, delle cellule coltivate nella fase di proliferazione e in quella di differenziamento. Normalmente, l'espressione della proteina di superficie CD71 aumenta durante la proliferazione e le prime fasi di differenziamento dei progenitori eritroidi, per diminuire nelle ultime fasi differenziali e di maturazione, come si vede in (30). Inoltre, la morfologia delle cellule eritroidi cambia durante lo sviluppo eritroide. Le cellule progenitrici grandi gradualmente diminuiscono,

fino a raggiungere una dimensione di circa 7 micrometri quando hanno espulso il nucleo. Come si vede in **Figura 4.3**, l'espressione della proteina di superficie CD71 è omogenea ed elevata nella popolazione di cellule proliferanti (**Fig 4.3A**). Invece, dopo 3 giorni di crescita nel terreno differenziativo, l'espressione di CD71 diminuisce, con la divisione di due popolazioni: una popolazione di cellule più grandi (valori di Forward Scatter nell'asse X più elevati), ed espressione elevata di CD71. La seconda popolazione è di cellule più differenziate/mature: più piccole (valori di Forward Scatter nell'asse X più bassi) in cui l'espressione di CD71 sta scomparendo.

A livello di espressione genica, abbiamo analizzato i livelli di mRNA del recettore dell'eritropoietina (EPOR) e della beta globina, entrambi marcatori di differenziamento eritroide. Come si vede in **Figura 4.3 B e C**, questi due geni sono poco espressi durante tutto il tempo di coltura in terreno proliferativo, ed aumentano bruscamente quando togliamo il terreno proliferativo per sostituirlo con terreno differenziativo.

L'analisi fenotipica delle cellule, trattate con i due metodi, ha mostrato che la combinazione dei due protocolli è risultata in un nuovo metodo valido per l'analisi della proliferazione, separatamente dall'analisi del differenziamento, dei precursori eritroidi.

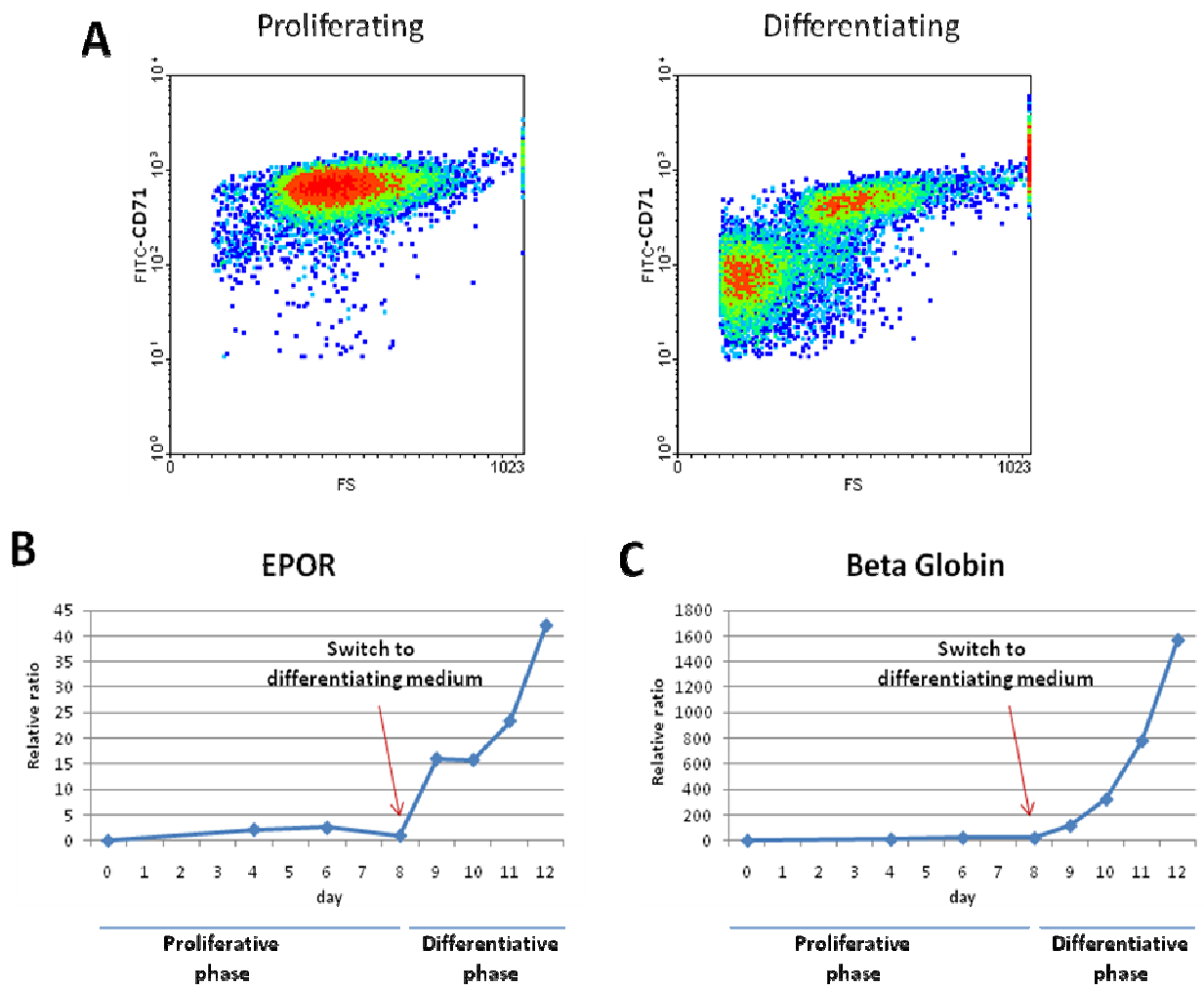


Figura 4.3 Analisi fenotipica delle cellule in fase proliferativa e fase differenziativa. (A) l'espressione di CD71 sulla superficie delle cellule è stata analizzata con citometri a flusso.

Seguendo questo metodo, il numero di cellule aumentava gradualmente in coltura, fino a raggiungere una espansione di quasi 100 volte in 8 giorni, e oltre 200 volte dopo 10 giorni, rispetto al numero di cellule messe in coltura al giorno 0 (**Fig 4.4, ◆**). Se le NP di Sb_2O_3 venivano aggiunte al giorno 0, oppure in qualsiasi momento durante la fase espansiva della coltura, la crescita cellulare si fermava immediatamente, come mostrato in Figura 3, in cui le NP vengono aggiunte alla coltura al giorno 0 (**Fig 4.4, sinistra, ■**) oppure al giorno 9 (**Fig 4.4, destra, ■**).

Questo esperimento ci ha suggerito che le NP fossero tossiche ai progenitori eritroidi nella fase di proliferazione.

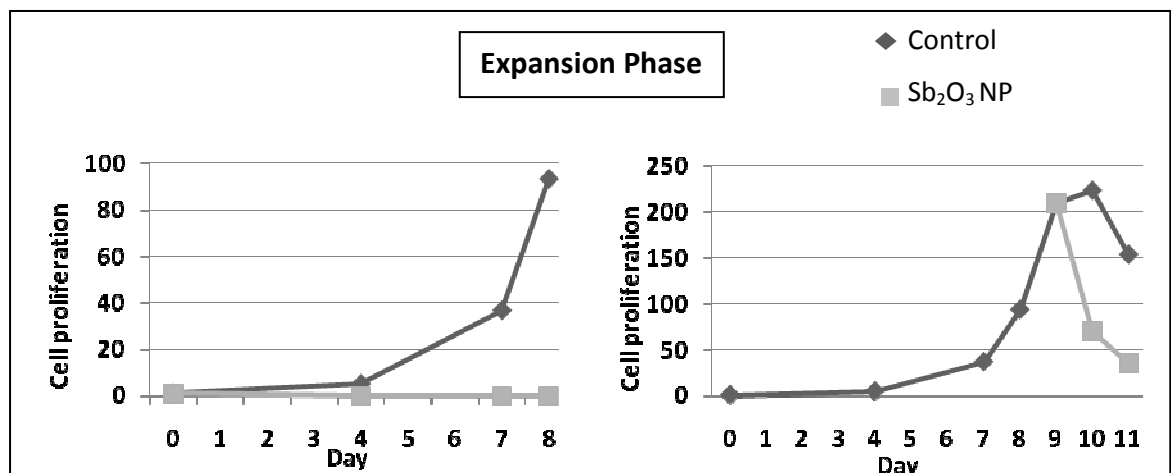


Figura 4.4 Coltura liquida dei progenitori eritroidi da cellule CD34+ del midollo osseo umano. In condizioni controllo (◆, senza NP aggiunte), la proliferazione aumenta gradualmente fino al giorno 10, in cui si ha una espansione cellulare di oltre 200 volte rispetto al numero di cellule messe in coltura il giorno 0; inseguito all'aggiutna di NP di Sb_2O_3 (■), la proliferazione è inibita e le cellule muoiono. Esperimento rappresentativo di 3 esperimenti separati, ciascuno eseguito in duplicato.

Ci siamo chiesti se l'effetto tossico fosse esercitato anche durante la fase del differenziamento. Per rispondere a questa domanda, abbiamo espanso le cellule provenienti dal midollo osseo nelle condizioni proliferative per 8 giorni, dopodichè abbiamo lavato le cellule, e le abbiamo messe in coltura in presenza di un terreno ottimizzato per il differenziamento delle cellule eritroidi (differentiative phase), per un periodo massimo di 4 giorni. In questo sistema, quando abbiamo aggiunto le NP di Sb_2O_3 durante la fase differenziativa, abbiamo osservato una crescita minimamente rallentata del numero di cellule, ma nessuna morte cellulare (on il metodo del Trypan blue) (**fig. 4.5 a**). I controlli mediante citometri a flusso ed PCR quantitativa hanno mostrato che le cellule trattate con NP di Sb_2O_3 durante la fase di differenziamento erano fenotipicamente simili alle cellule controllo non trattate (**fig. 4.5 b-d**), suggerendo che le NP di Sb_2O_3 non esercitano l'effetto tossico durante il differenziamento dei progenitori eritroidi.

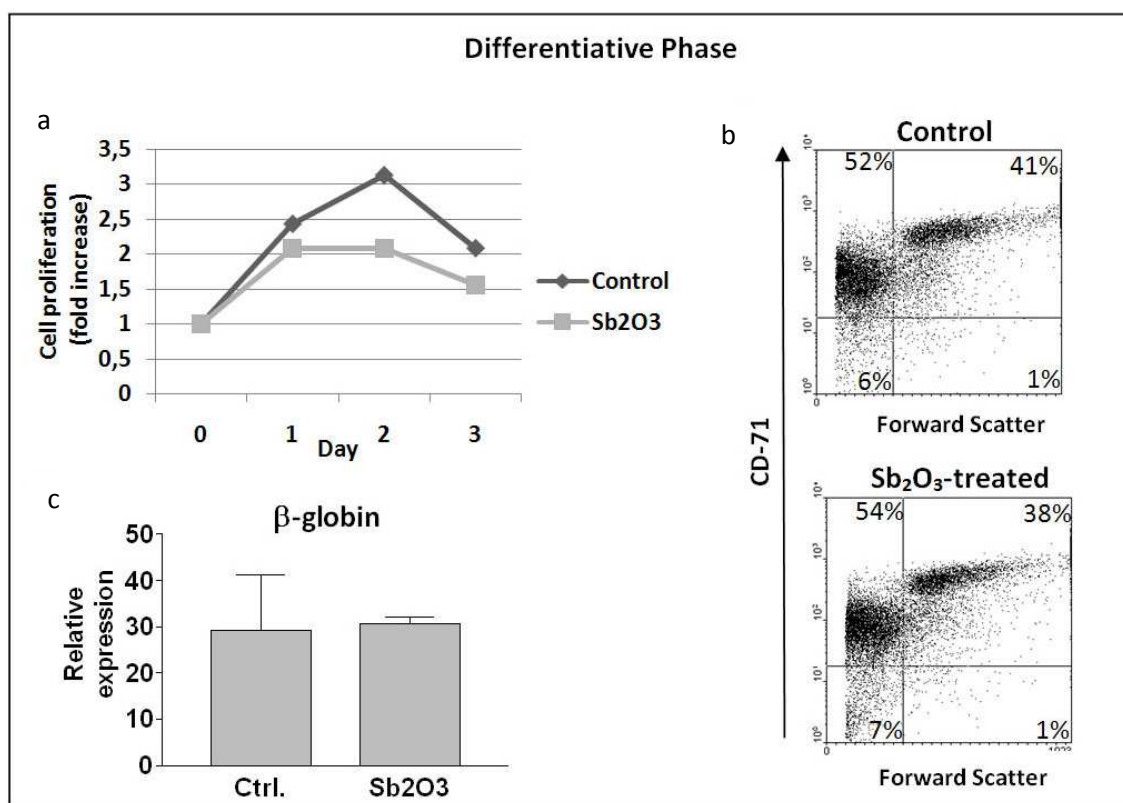


Figura 4.5 Effetto del trattamento delle cellule midollari CD34+ con NP di Sb_2O_3 durante la fase differenziativa, dopo 8 giorni di coltura in terreno per la proliferazione e successiva coltura in terreno differenziativo per 3 giorni. Le NP sono state aggiunte al giorno 0 della fase differenziativa. (a) proliferazione in assenza o presenza delle NO (5ppm). Asse Y: aumento del numero di cellule. Esperimento rappresentativo di 3 esperimenti separati. (d) Citometria a flusso in assenza (riquadro superiore) o presenza delle NP di Sb_2O_3 .

4.3 ANALISI DELL'INTERAZIONE TRA Sb_2O_3 E CELLULE PROGENITRICI ERITROIDI

Un elemento fondamentale per comprendere il meccanismo di tossicità delle nanoparticelle è l'analisi del contatto fisico tra le NP e le cellule, e l'eventuale localizzazione intracellulare delle particelle. Nel sistema che abbiamo sviluppato in questo studio, abbiamo visto che le NP di Sb_2O_3 esercitano un effetto tossico sulle cellule progenitrici eritroidi ("rosse"), mentre non mostrano un effetto tossico sui progenitori monociti-granulociti ("bianchi"). Abbiamo quindi ritenuto interessante vedere quale interazione ci sia tra queste nanoparticelle ed i due tipi di progenitori, per determinare se la differenza di effetto possa essere dovuta ad una interazione fisica diversa con i progenitori "rossi" rispetto ai progenitori "bianchi".

Abbiamo eseguito analisi con un microscopio elettronico a scansione e trasmissione (STEM) su campioni di cellule eritroidi cresciute in terreno proliferativo per 8 giorni, e trattate con NP di Sb_2O_3 per 0, 6 o 24 ore (**fig. 4.6**).

In figura 6, si può notare la cellula controllo (**fig. 4.6a**), che ha le caratteristiche di un progenitore eritroide normale con elevata proporzione nucleo/citoplasma e cromatina dispersa con presenza di nucleoli. Dopo 6 ore di trattamento con NP di Sb_2O_3 (**fig. 4.6b,c**), circa il 50% delle cellule aveva una morfologia molto alterata, con nuclei piccoli, cromatina più condensata e marginata e grandi vacuoli apparentemente vuoti, che potevano raggiungere e superare un diametro di 2 micrometri. La superficie di queste cellule era molto più irregolare rispetto alle cellule controllo, con un citoplasma meno elettron denso. In queste cellule che avevano una morfologia alterata, le NP erano localizzate vicino alla superficie cellulare. In molti casi, le NP apparivano incluse nella porzione marginale della membrana plasmatica (**fig. 4.6c** e inserto).

Dopo 24 ore di trattamento (**fig. 4.6d**), le cellule apparivano principalmente distrutte, con formazioni che assomigliavano a corpi apoptotici e cellule apoptotiche. Questo era in linea con le osservazioni al microscopio ottico, attraverso il quale le cellule trattate per 24 ore apparivano morfologicamente alterate, scure e di dimensioni inferiori. L'identità chimica delle NP è stata determinata con EDS.

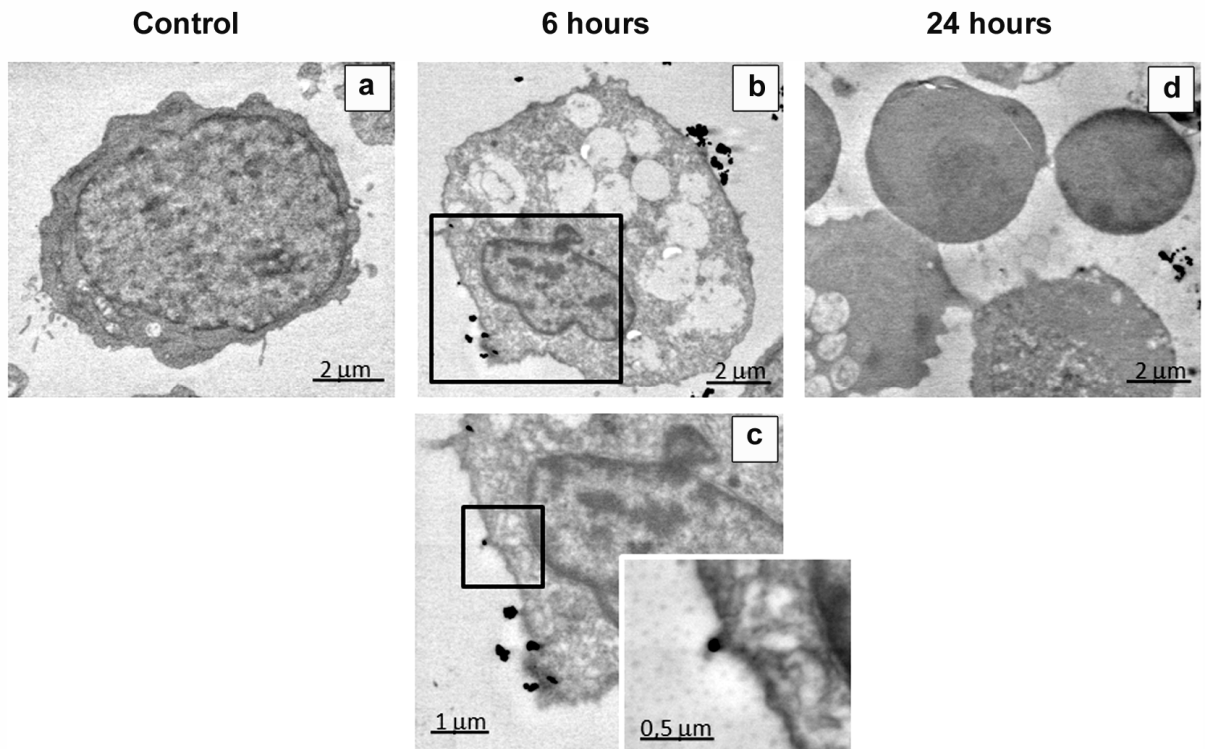


Figura 4.6 Analisi al microscopio elettronico (STEM). Cellule CD34+ del midollo osseo umano sono state cresciute per 8 giorni in terreno proliferativo. Le NP di Sb_2O_3 (5ppm) sono state aggiunte 6 ore (b,c) o 24 ore (d) prima della preparazione dei campioni. (a) cellula non trattata con NP.

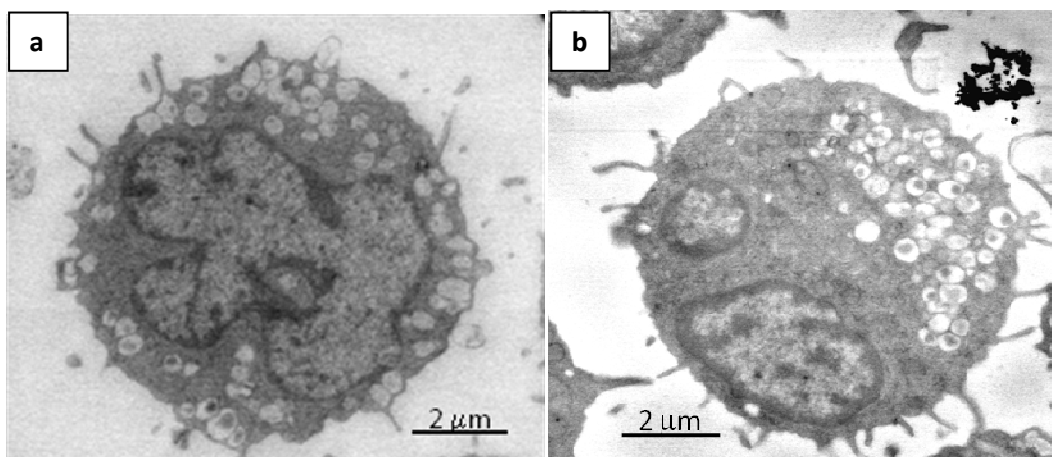


Figura 4.7 STEM analisi di precursori granulocitici-monocitici in assenza (a) o presenza per 14 giorni (b) di NP di Sb_2O_3 .

L'inclusione intracellulare di NP di Sb_2O_3 in progenitori eritroidi non è stata osservata nei campioni analizzati. Una piccola percentuale (circa 1-2%) delle cellule avevano inclusioni intracellulari di NPs, ma l'identità di queste cellule più rare non è risultata chiara. Infatti, queste cellule avevano una morfologia che non appariva corrispondente a cellule apoptotiche, né a precursori eritroidi, né a precursori granulocitici-monocitici. Una somiglianza a precursori megacariocitici è stata notata, ma nessun esperimento di marcatura con specifici marcatori è stato eseguito per determinare l'identità di queste rare cellule.

Per l'osservazione allo STEM di cellule della linea granulocitica-monocitica, abbiamo estratto colonie bianche da colture semisolide in metilcellulosa (CFU assay descritto in sezione 4.1), che erano state incubate per 14 giorni in presenza o assenza di NP di Sb_2O_3 alla concentrazione di 5 ppm.

I campioni sono stati preparati ed analizzati nello stesso modo in cui sono stati trattati i campioni eritrocitici. L'osservazione ha mostrato che, almeno nei campioni da noi osservati, non c'era un contatto fisico tra le nanoparticelle e le cellule granulocitiche-monocitiche (**fig. 4.7**).

L'analisi allo STEM ha mostrato che l'interazione delle NP di Sb_2O_3 con i progenitori eritroidi avviene a livello della membrana plasmatica. Questa interazione non avviene con i progenitori granulocitici-monocitici.

4.4 ANALISI DEL SIGNALING

Dai dati mostrati fin qui, si evince che le NP di Sb_2O_3 interagiscono con la membrana cellulare dei progenitori eritroidi durante il processo di proliferazione e lo inibiscono inducendo morte cellulare. Questo effetto tossico non si manifesta se le NP vengono messe a contatto con le cellule progenitrici durante la fase del differenziamento, e neppure se le cellule progenitrici sono entrate nella via differenziativa dei monociti-macrofagi anziché nella via eritroide. Queste osservazioni fanno pensare ad un meccanismo specifico di tossicità, ovvero che danneggia la cellula soltanto durante alcuni momenti della sua vita (proliferazione), ma che è già destinata ad una particolare funzione (globulo rosso, anziché granulocito-monocito).

Questo primo passo, verso la identificazione dei meccanismi di tossicità delle NP di Sb_2O_3 , ci ha spinto ad indagare quali siano i primi segnali di tossicità che la cellula manifesta, attraverso l'analisi dell'espressione genica ed il paragone tra cellule non trattate e cellule trattate con NP di Sb_2O_3 a 5 ppm. Per questo, abbiamo coltivato in terreno di proliferazione le cellule progenitrici CD34^+ del midollo umano per 8 giorni, al fine di avere un numero sufficiente di cellule per l'esperimento di *gene expression analysis*. Al giorno 8, abbiamo diviso la coltura in 2 campioni uguali, trattato uno dei due con le nanoparticelle per 6 ore, e poi raccolto i campioni ed estratto l'RNA. Abbiamo scelto questo *time point* poichè dagli studi di microscopia elettronica esposti sopra, avevamo visto che già dopo 6 ore le cellule avevano accumulato alterazioni morfologiche notevoli; dopo 24 ore di trattamento, invece, le cellule apparivano morte, quindi non ci era sembrato opportuno raccogliere materiale genetico da quest'ultimo tipo di campione. Mediante l'utilizzo di un kit commerciale, abbiamo estratto l'RNA totale, retrotrascritto l'mRNA in cDNA, e poi abbiamo analizzato l'espressione di 84 geni, oltre ai geni di controllo, che sono implicati in diverse vie di trasduzione del segnale.

L'elenco dei geni analizzati e dell'*up-regulation* o *down-regulation* di questi geni, in campioni trattati rispetto a campioni controllo, è illustrato in **Tabella 4.1**.

Tabella 4.1 *Gene expression analysis*, paragone tra cellule controllo e cellule trattate con NP di Sb₂O₃ a 5 microg/ml. *= differenza non confermata con PCR quantitativa.

Symbol	Description	Gene Name	Control Ct value	Sb ₂ O ₃ NP treated Ct value	Fold Up- or Down- Regulation
ATF2	Activating transcription factor 2	CRE-BP1/CREB2	26.06	26.11	1.00
BAX	BCL2-associated X protein	Bax zeta	25.33	25.21	1.13
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	32.43	31.58	1.87
BCL2A1	BCL2-related protein A1	ACC-1/ACC-2	31.06	31.12	-1.01
BCL2L1	BCL2-like 1	BCL-XL/S	28.3	28.1	1.19
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	BIRC1/NLRB1	29.01	29.1	-1.03
BIRC2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	API1/HAIP2	25.68	25.76	-1.02
BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	AIP1/API2	31.91	32.01	-1.03
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	BMP2A	Undet	38.77	
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	BMP2B/BMP2B1	37.18	Undet	
BRCA1	Breast cancer 1, early onset	BRCA1/BRCC1	25.72	25.55	1.17
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	GDCF-2/GDCF-2 HC11	31.82	32.66	-1.73
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	CKb4/LARC	Undet	Undet	
CCND1	Cyclin D1	BCL1/D11S287E	31.53	31.71	-1.09
CD5	CD5 molecule	LEU1/T1	Undet	Undet	
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	p33(CDK2)	24.98	24.88	1.11
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1	26.26	26.37	-1.04
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	CDKN4/KIP1	26.13	26.25	-1.05
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	ARF/CDK4I	28.09	28.22	-1.06

Risultati

Symbol	Description	Gene Name	Control Ct value	Sb ₂ O ₃ NP treated Ct value	Fold Up- or Down- Regulation
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	C/EBP-beta	28.11	27.51	1.57
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	GMCSF	34.38	35.32	-1.48
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand9	CMK/Humig	Undet	Undet	
CYP19A1	Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1	ARO/ARO1	Undet	Undet	
EGR1	Early growth response 1	AT225/G0S30	31.85	32.33	-1.34
EN1	Engrailed homeobox 1	Engrailed 1	Undet	Undet	
FAS	Fas	ALPS1A/APO-1	26.43	26.44	1.03
FASLG	Fas ligand	APT1LG1/CD178	37.19	38.36	
FASN	Fatty acid synthase	FAS/OA-519	26.37	26.17	1.19
FN1	Fibronectin 1	CIG/DKFZp686F10164	Undet	Undet	
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	c-fos	30.26	30.24	1.05
FOXA2	Forkhead box A2	HNF3B/TCF3B	Undet	Undet	
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	DDIT1/GADD45	27.04	27.03	1.04
GREB1	GREB1 protein	KIAA0575	Undet	38.29	
GYS1	Glycogen synthase 1 (muscle)	GSY/GYS	26.34	26.43	-1.03
HK2	Hexokinase 2	DKFZp686M1669/HKII	34.59	34.75	-1.08
HOXA1	Homeobox A1	BSAS/HOX1	36.09	37.21	
HSF1	Heat shock transcription factor 1	HSTF1	24.44	24.67	-1.13
HSPB1	Heat shock 27kDa protein 1	CMT2F/DKFZp586P1322	22.89	22.2	1.67
HSP90AA2	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2	HSP90ALPHA/HSPCA	28.3	27.48	1.83

Risultati

Symbol	Description	Gene Name	Control Ct value	Sb ₂ O ₃ NP treated Ct value	Fold Up- or Down- Regulation
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3	BP-53/IBP3	Undet	Undet	
IKBKB	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKK-beta/IKK2	26.65	26.8	-1.07
<u>IL1A</u>	<u>Interleukin 1, alpha</u>	<u>IL-1A/IL1</u>	<u>31.65</u>	<u>32.72</u>	<u>-2.02 *</u>
IL2	Interleukin 2	IL-2/TCGF	Undet	Undet	
IL4	Interleukin 4	BSF1/IL-4	38.94	Undet	
IL4R	Interleukin 4 receptor	CD124/IL4RA	27.52	27.8	-1.17
IL8	Interleukin 8	3-10C/AMCF-I	31.35	31.37	1.02
IRF1	Interferon regulatory factor 1	IRF-1/MAR	31.33	30.9	1.40
JUN	Jun oncogene	AP1/c-Jun	35.15	34.35	1.63
KLK2	Kallikrein-related peptidase 2	KLK2A2/hK2	Undet	37.2	
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	DKFZp586H0919/TCF1ALPHA	31.11	31.28	-1.08
LEP	Leptin	OB/OBS	Undet	Undet	
LTA	Lymphotoxin alpha	LT/TNFB	Undet	37.02	
MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	HDMX/hdm2	24.37	24.33	1.07
MMP10	Matrix metalloproteinase 10	SL-2/STMY2	Undet	Undet	
MMP7	Matrix metalloproteinase 7	MMP-7/MPSL1	37.07	38.13	
MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc	27.45	27.39	1.08
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	DKFZp686C01211/EBP-1	24.96	25.15	-1.10

Risultati

Symbol	Description	Gene Name	Control Ct value	Sb ₂ O ₃ NP treated Ct value	Fold Up- or Down- Regulation
NRIP1	Nuclear receptor interacting protein 1	RIP140	26.8	26.76	1.07
ODC1	Ornithine decarboxylase 1	Ornithine decarboxylase	22.54	23.01	-1.34
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31)	CD31/PECAM-1	31.76	32.19	-1.30
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NR1C3/PPARG1	36.73	36.94	
PRKCA	Protein kinase C, alpha	AAG6/PKC-alpha	31.69	31.9	-1.12
PRKCE	Protein kinase C, epsilon	PKCE/nPKC-epsilon	32.68	32.99	-1.20
PTCH1	Patched homolog 1 (Drosophila)	BCNS/HPE7	37.49	37.2	
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	COX-2/COX2	30.8	30.44	1.33
RBP1	Retinol binding protein 1, cellular	CRABP-I/CRBP	Undet	Undet	
SELE	Selectin E	CD62E/ELAM	Undet	Undet	
SELPLG	Selectin P ligand	CD162/CLA	25.35	25.49	-1.06
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	I-TRAF/TRAF2	30.16	29.42	1.73
TCF7	Transcription factor 7 (TCF-1	Undet	38.41	
TERT	Telomerase reverse transcriptase	EST2/TCS1	Undet	Undet	
TFRC	Transferrin receptor (p90, CD71)	CD71/TFR	17.92	18.14	-1.12
TMEPAI	Transmembrane, prostate androgen induced RNA	PMEPA1/STAG1	34.76	35.22	-1.14
TNF	Tumor necrosis factor	DIF/TNF-alpha	36.15	35.42	
TP53	Tumor protein p53	LFS1/TRP53	25	24.97	1.06
TP53I3	Tumor protein p53 inducible protein 3	PIG3	26.62	26.34	1.26

Risultati

Symbol	Description	Gene Name	Control Ct value	Sb ₂ O ₃ NP treated Ct value	Fold Up- or Down- Regulation
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	VEGF/VEGF-A	25.29	25.02	1.25
WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	CCN4/WISP1c	Undet	Undet	
WNT1	Wingless-typeMMTV integration site family, member 1	INT1	38.89	Undet	
WNT2	Wingless-typeMMTV integration site family member 2	INT1L1/IRP	36.46	35.16	1.04
B2M	Beta-2-microglobulin	B2M	22.06	22.19	-1.06
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HGPRT/HPRT	23.93	23.85	1.10
RPL13A	Ribosomal protein L13a	RPL13A	20.32	20.45	-1.06
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PD/GAPD	19.04	19.07	1.02
<u>ACTB</u>	<u>Actin, beta</u>	<u>PS1TP5BP1</u>	<u>20.05</u>	<u>28.29</u>	<u>-291.53 *</u>

Nessuno dei geni riportati in **tabella 4.1** è risultato significativamente diverso tra il campione controllo ed il campione di cellule trattate. L'unica eccezione è stata notata per due geni, ovvero IL1alpha e actin-beta. In questi casi, però, si è trattato di una variazione interna al sistema o di un errore, infatti con la real time-PCR abbiamo appurato che in realtà questi due geni non sono espressi diversamente nei due campioni.

Questi risultati ci hanno suggerito che le vie di trasduzione del segnale in cui questi geni vengono modulati non vengono alterate in conseguenza del contatto delle cellule eritroidi con le NP di Sb₂O₃, almeno entro 6 ore dall'esposizione. Ulteriori studi di gene expression analysis e di espressione delle proteine sono necessari per identificare il meccanismo molecolare in cui le NP di Sb₂O₃ danneggiano le cellule progenitrici eritroidi in un tempo così breve (6 ore), mentre sono apparentemente innocue alle cellule progenitrici della stessa origine, che daranno luogo però a monociti-macrofagi.

4.5 EFFETTO DELLE NANOPARTICELLE DI Sb_2O_3 SU PROLIFERAZIONE E DIFFERENZIAMENTO DI LINEE CELLULARI

I dati presentati nelle sezioni precedenti hanno mostrato che le nanoparticelle di Sb_2O_3 alla concentrazione di 5 microgrammi/ml (o 5 ppm) hanno un effetto tossico per le cellule progenitrici nella linea eritroide durante la fase di proliferazione, mentre questo effetto non è stato osservato per le stesse cellule durante il processo di differenziamento o per cellule progenitrici della linea granulocitica-monocitica della stessa origine (midollo osseo umano). Poiché parecchie linee cellulari vengono quotidianamente utilizzate in molti laboratori di ricerca per determinare la tossicità di composti e nanoparticelle, ci siamo chiesti se le linee cellulari più utilizzate, e derivanti dalla stessa cellula originale ematopoietica umana rispetto alle colture utilizzate nelle sezioni precedenti, possano essere utilizzate come modello attendibile della tossicità delle NP di Sb_2O_3 . Questo, ovviamente, faciliterebbe tutto il lavoro di ricerca sui meccanismi di tossicità di queste nanoparticelle.

Come elemento di paragone, ci siamo domandati se l'effetto tossico sulla proliferazione cellulare che abbiamo osservato in questo studio sia riproducibile con le linee cellulari umane di origine ematopoietica Jurkat, CEM, CEM-R (cellule della linea CEM rese insensibili al farmaco vinblastina per selezione di cloni resistenti) e Molt-4 della linea linfoide; HL-60, K562, e Thp-1 della linea mieloide. Per questo fine, abbiamo coltivato le cellule delle diverse linee in condizioni proliferative, ovvero in terreno di coltura RPMI-1640 con l'aggiunta di FBS al 10%, glutammina e gli antibiotici penicillina e streptomycin. Le abbiamo poi trattate con NP di Sb_2O_3 a 5 ppm per 4 giorni, dopodiché abbiamo paragonato la proliferazione cellulare in presenza ed in assenza delle nanoparticelle. Nessuna di queste linee cellulari ha mostrato subire un effetto tossico in presenza delle nanoparticelle di Sb_2O_3 , in termini di proliferazione cellulare, come mostrato in **fig. 4.8**.

Risultati

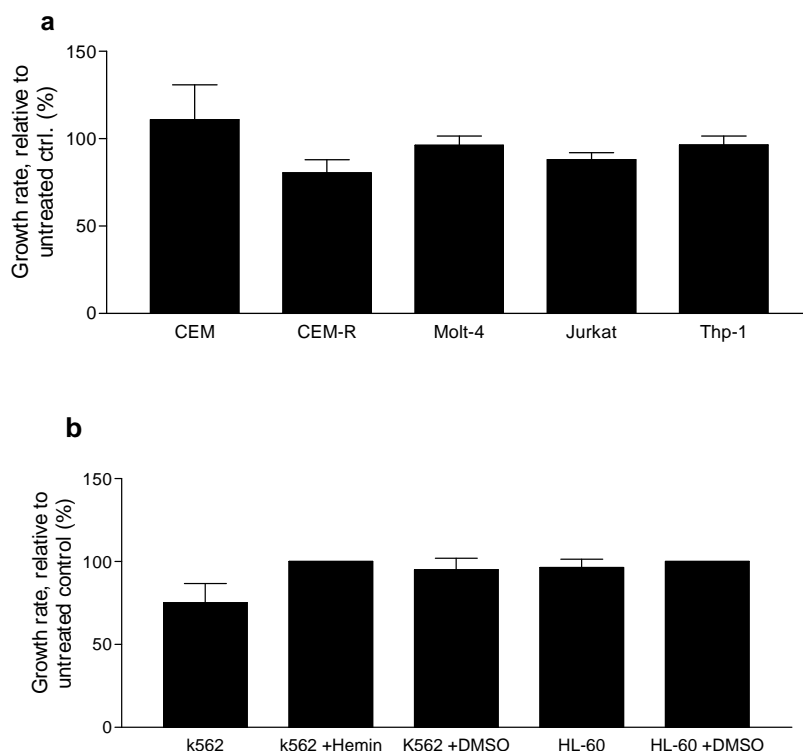


Figura 4.8 Proliferazione delle cellule appartenenti alle linee cellulari indicate, in presenza di NP di Sb_2O_3 a 5 ppm. Asse Y: numero di cellule dopo 4 giorni in coltura, espresso come percentuale confronto al controllo non trattato. Barre di errore: deviazione standard. $n=2$, ciascuno in duplicato.

Ci siamo inoltre chiesti se le nanoparticelle di Sb_2O_3 potessero interferire sulla vitalità e velocità di proliferazione delle cellule che entrano nella via del differenziamento. Il terreno di crescita è stato supplementato con fattori come emina o DMSO per il differenziamento delle cellule K562 in eritrociti; con DMSO per il differenziamento delle cellule HL-60 in granulociti; con PMA per il differenziamento delle cellule Thp-1 in macrofagi. Dopo 4 giorni di coltura in presenza dei fattori differenziativi, la crescita delle cellule k562 e HL-60 non è risultata alterata nei campioni trattati con le NP rispetto ai campioni controllo in cui le NP non erano state aggiunte.

Al contrario, nel caso delle cellule della linea Thp-1 abbiamo osservato un effetto tossico sulla vitalità delle cellule trattate con NP di Sb_2O_3 durante il differenziamento in macrofagi (fig. 4.9). Le cellule di questa linea crescono in sospensione in terreno proliferativo RPMI-1640 con FBS al 10% e glutammina, e si presentano grandi e tondeggianti. Se in questo terreno aggiungiamo le NP di Sb_2O_3 , le cellule mantengono la morfologia normale. Se,

invece, coltiviamo le cellule in un terreno differenziativo, cioè in presenza di PMA, le cellule entrano nella via differenziativa dei macrofagi. In questo caso, le cellule cessano di proliferare immediatamente, si attaccano al fondo del pozzetto di coltura in gruppetti e assumono una morfologia allungata. L'aggiunta delle NP di Sb_2O_3 al momento dell'aggiunta di PMA ha avuto un effetto tossico sulla vitalità di queste cellule (**fig. 4.9**), prevenendone l'attaccamento al fondo del pozzetto ed inducendo morte cellulare.

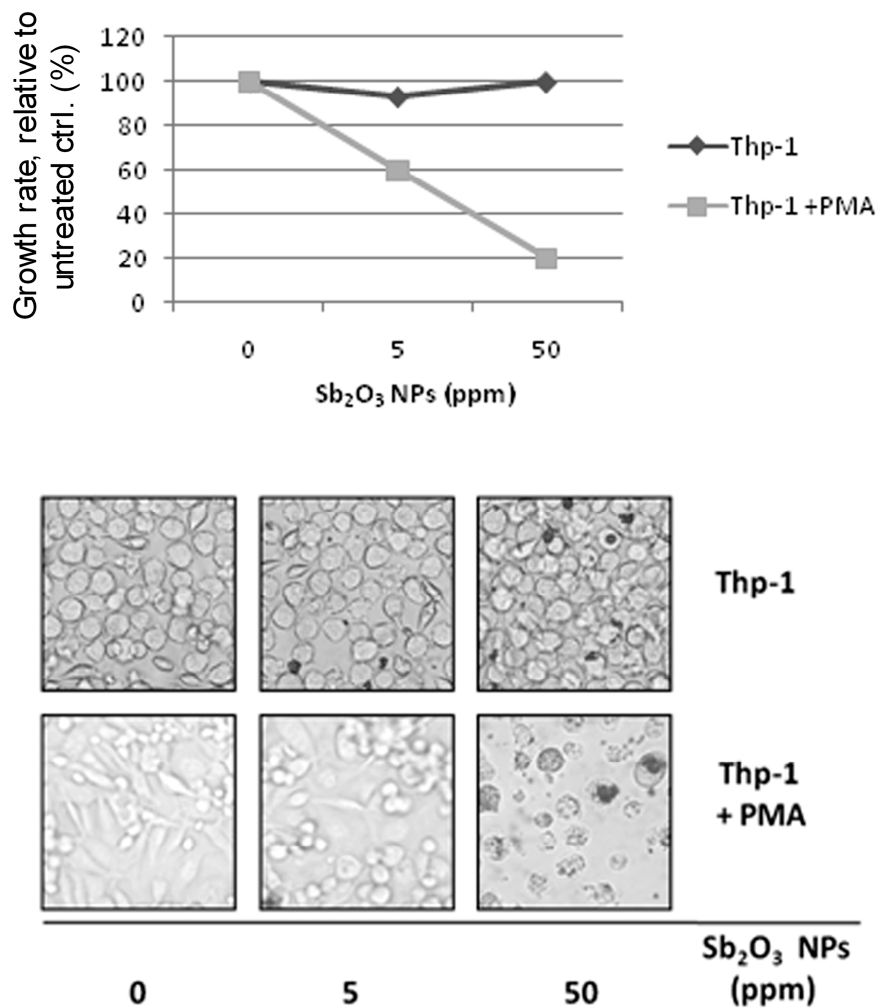


Figura 4.9 Grafico in alto: vitalità delle cellule a 4 giorni di coltura in terreno proliferativo oppure terreno differenziativo (con PMA). Asse Y

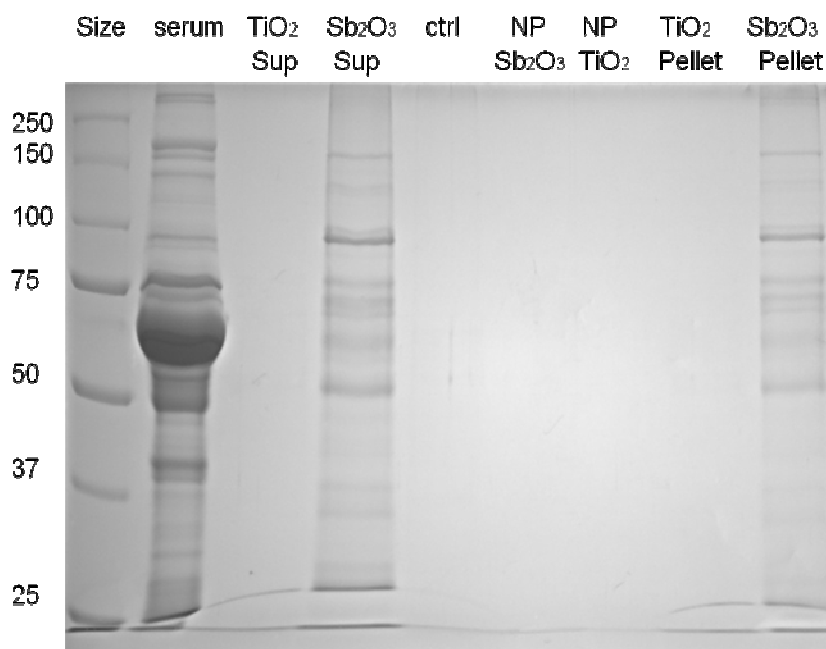
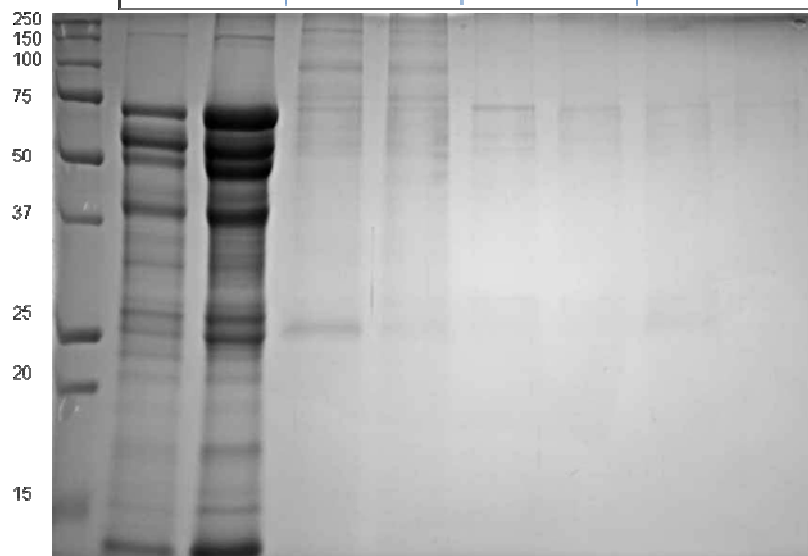
4.6 INTERAZIONE DELLE NANOPARTICELLE CON PROTEINE SIERICHE

Quando le NP entrano nel circolo sanguigno, attraverso l'assorbimento polmonare, intestinale, epidermico o per iniezione diretta in vena, esse interagiscono immediatamente con i componenti del sangue, ovvero cellule, proteine e molecole. A seconda della composizione chimica e delle proprietà chimico-fisiche dei diversi tipi di nanomateriali, questi possono interagire in modo diverso con le proteine del sangue. Alcune NP si legano alle proteine formando una corona, altre invece formano legami molto più deboli. Durante il lavoro illustrato in questa tesi, ci siamo chiesti se le NP di Sb_2O_3 si leghino a qualche componente proteico del sangue. Per rispondere a questa domanda, abbiamo incubato le NP di Sb_2O_3 , TiO_2 o Co in presenza di siero umano, che era stato preventivamente deplementato e filtrato. Dopo 4 ore di incubazione con costante agitazione, abbiamo centrifugato i campioni, lavato il pellet con 3 diversi tamponi a stringenza diversa, separato tramite gel elettroforesi, ed infine abbiamo colorato con Comassie Blue per evidenziare la presenza di proteine che fossero precipitate assieme alle nanoparticelle.

Il risultato, mostrato in **fig 4.10**, mostra che le NP di Sb_2O_3 si legano a proteine del siero. Le nanoparticelle di TiO_2 e Co, invece, non sembrano legarsi a proteine, nelle condizioni sperimentali utilizzate in questo lavoro. Tre diversi buffer di lavaggio sono stati utilizzati: nel gel in fig 4.10a sono stati utilizzati PBS e RIPA buffer, mentre nel gel di fig.4.10b è stato utilizzato un immunoprecipitation wash buffer (vedi materiali e metodi). I due gel, inoltre, sono stati creati con diverse concentrazioni di acrilammide, per essere in grado di notare proteine in diversi range di dimensioni. Sorprendentemente, i diversi buffer non hanno influito sull'identità delle bande, che risultano simili nei due gel (tenendo conto che sono a concentrazioni di acrilammide diverse, e quindi i marcatori sono ad altezze diverse). Questo può indicare che il legame delle nanoparticelle di Sb_2O_3 con le proteine sieriche è abbastanza forte e specifico da non essere influenzato dalla stringenza del buffer di lavaggio.

Ulteriori esperimenti, utilizzando le tecniche della proteomica, potranno in futuro determinare l'identità delle proteine sieriche che si legano alle nanoparticelle di Sb_2O_3 .

Stero 1 ul 2ul	Sb203 PBS RIPA	Co PBS RIPA	Control PBS RIPA
------------------------	------------------------	---------------------	--------------------------



a: gel al 12%. Prima lane: marcatore di peso, seconda e terza lanes: proteine sieriche del campione non centrifugato. Le successive due *lanes* contengono le proteine precipitate assieme alle NP di Sb₂O₃, con lavaggi in PBS o RIPA buffer. Accanto, due *lanes* contenenti proteine precipitate con le NP di Co, che coincidono con il *background* che si può notare nelle ultime due *lanes*, in cui è stato caricato il residuo precipitato dal controllo in cui non erano stati introdotte NP.

71

4.7 CARATTERIZZAZIONE DELLE NANOPARTICELLE

Le nanoparticelle metalliche e di ossidi di metallo tendono ad aggregarsi in soluzione, formando agglomerati che raggiungono dimensioni di alcune centinaia di nanometri, ed a volte alcuni micrometri. E' importante sapere le dimensioni delle particelle e degli aggregati che si stanno studiando, in quanto diverse dimensioni possono dare luogo ad effetti biologici e tossici completamente diversi. Inoltre, è stato dimostrato che le stesse nanoparticelle disperse in diversi terreni possono dare luogo a diversi stati di aggregazione (34). Si rende quindi indispensabile, ogni volta che si analizza l'effetto di nanoparticelle su sistemi biologici, testare empiricamente il loro stato di aggregazione nel terreno si utilizza per gli esperimenti cellulari.

Per determinare lo stato di aggregazione delle sospensioni di nanoparticelle e le dimensioni degli aggregati, abbiamo utilizzato la tecnica del photon correlation spectroscopy, basata sul dynamic light scattering (DLS). Abbiamo risospeso le nanoparticelle nei diversi terreni di coltura utilizzati per gli esperimenti cellulari. Poiché il terreno di coltura utilizzato nel saggio di formazione delle colonie (CFU assay) è semisolido, e quindi incompatibile con una misurazione accurata tramite la tecnica del dynamic light scattering, abbiamo scelto come "surrogato" il terreno di base, senza l'aggiunta della metilcellulosa. Quindi, le nanoparticelle di Au, TiO₂, Fe₂O₃, Fe₃O₄, Ag, Sb₂O₃ e Co sono state disperse in IMDM con l'aggiunta di FBS al 30%. Anche per la scelta della concentrazione delle NP da testare abbiamo dovuto scegliere un compromesso, tra la concentrazione utilizzata nei test ed una concentrazione che fosse ottimale per il DLS. Per questo, abbiamo scelto 50 ppm, in quanto 5 ppm era una concentrazione troppo bassa per consentire un sufficiente count rate.

Dall'analisi mostrata in **Tabella 4.2**, si vede che tutte le nanoparticelle sospese in IMDM con 30% FBS sono molto aggregate, con un indice di polidispersione (PDI) molto elevato. Le dimensioni degli aggregati e relative percentuali, calcolate con il software Contin e mostrate qui in funzione dell'intensità, sono differenti per le diverse NP. Le nanoparticelle di Fe₃O₄ sono risultate le meno aggregate, con il 70% della popolazione aventi un

diametro di 138 nm, mentre le NP di sono le più aggregate con il 100% delle particelle appartenenti ad un unico picco di diametro medio di 2313 nm. La soluzione di NP di Ag, che è stata misurata a 5 ppm, ha mostrato che l'88% di queste NP hanno un diametro medio di 120 nm, ma questo risultato è da prendere con cautela poiché il numero delle conte al secondo è basso (10.3 kCps), dovuto alla bassa concentrazione di NP nella soluzione. Le NP di Co formano aggregati di grosse dimensioni, che si sono sedimentate troppo in fretta e non hanno reso possibile la misurazione con questa tecnica.

Particle (size)	Concentr. (ppm)	Peak analysis by intensity			Pdl
		Peak Width	Area(%)	Mean (nm)	
Fe ₃ O ₄ (20-30nm)	50	1	70.2	138.3	1.00
		2	29.8	1471.7	
Fe ₂ O ₃ (55-65nm)	50	1	33.9	372.1	1.00
		2	66.1	1744.5	
Sb ₂ O ₃ (41-91nm)	50	1	61.9	317.9	1.00
		2	28.5	2573.9	
		3	9.6	8286.1	
Au (50-100nm)	50	1	89.6	93.8	1.00
		2	10.4	2778.0	
TiO ₂ (20-160nm)	50	1	100	2313.4	1.00
Ag(90-210nm)	5	1	87.6	119.7	1.00
		2	12.4	3540.0	

Tabella 4.2 *Size distribution* delle varie soluzioni di NP a 50ppm in IMDM+30%FB.

La **Tabella 4.3** mostra i risultati dell'analisi DLS delle nanoparticelle di Sb₂O₃ che sono state diluite in 3 differenti terreni di coltura utilizzati negli esperimenti cellulari. La concentrazione delle NP di Sb₂O₃ nella misurazione con DLS è 50 ppm, ovvero 10 volte superiore rispetto alla concentrazione di queste nanoparticelle negli esperimenti (5ppm).

Il fatto che la concentrazione sia più alta nella misurazione di DLS rispetto agli esperimenti cellulari, porta ad una sovrastima della aggregazione delle NP, ma concentrazioni più basse avrebbero causato una misura inesatta al DLS. I terreni utilizzati per il DLS sono: “RPMI+10%FBS”, ovvero il terreno utilizzato per la coltura delle linee cellulari RPMI, consistente in RPMI-1640 con l’aggiunta di glutammina, penicillina-streptomicina e FBS al 10%; “IMDM completo senza siero”, che è il terreno utilizzato per la fase di espansione delle cellule progenitrici del midollo osseo umano; “IMDM+30%FBS” è IMDM con il supplemento di FBS al 30%, utilizzato come surrogato del terreno semisolido.

Medium	Particle Concentr. (ppm)	Peak analysis by intensity				Pdl
		Peak	Area (%)	Mean (nm)	Width	
RPMI+10%FBS	50					0.88
		1	67.8	395.9	16.3	
		2	30.9	2936.6	1031.3	
		3	1.3	9654.0	636.6	
IMDM complete w/o serum	50					1.00
		1	66.4	292.1	5.2	
		2	26.0	2190.8	655.4	
		3	7.6	8894.0	621.8	
IMDM+30%FBS	50					1.00
		1	61.9	317.9	44.0	
		2	28.5	2573.9	1119.9	
		3	9.6	8286.1	490.8	
IMDM+30%FBS	5					1.00
		1	90.5	102.0	3.3	
		2	9.5	3122.0	218.3	

Tabella 4.3 *Size distribution* delle NP di Sb_2O_3 (41-91 nm) nei diversi terreni utilizzati per le colture cellulari.

5. DISCUSSIONE

I nanomateriali sono utilizzati nella produzione industriale dei prodotti più disparati, e stanno entrando sempre più velocemente nella vita quotidiana, tanto che si stima attorno a 800 il numero di prodotti che contengono nanomateriali e sono presenti sul mercato oggi. D'altro canto, le nanoparticelle derivanti dalla combustione sono da alcuni additate come la componente più nociva dell'inquinamento atmosferico che causa malattie cardiovascolari, ischemia del miocardio, aritmia e infarto (32). Nonostante questi due discordanti dati di fatto, la comunità scientifica non ha ancora raggiunto una sufficiente comprensione del reale rischio dovuto alla presenza di nanoparticelle e nanomateriali nell'aria che respiriamo, nei cibi che mangiamo, nei cosmetici che applichiamo sulla nostra pelle, nei dentifrici, nei tessuti, ed in tutti i prodotti che volontariamente o involontariamente contengono nanomateriali.

La totale mancanza di una presa di posizione della comunità scientifica sulla tossicità delle nanoparticelle è dovuta al fatto che le conoscenze di base sulle caratteristiche fisico-chimiche dei nanomateriali e la loro relazione con i meccanismi biologici sono del tutto insufficienti. Le caratteristiche dei materiali a livello "nano" sono ritenute totalmente diverse dalle caratteristiche degli stessi materiali in forma molecolare o di massa. Ne consegue il dubbio, spesso provato da dati sperimentali, che la tossicità dei nanomateriali non possa essere semplicemente dedotta né regolata da studi e leggi di tossicità classica e che debbano essere costruite norme e protocolli standard su misura, per i nanomateriali.

Il lavoro esposto in questa tesi ha avuto come risultato l'identificazione di un sistema semplice in cui testare la tossicità delle nanoparticelle, come alternativa alle linee cellulari immortalizzate utilizzate in molti studi di tossicità classica. Per questo motivo abbiamo scelto di utilizzare cellule progenitrici umane derivate direttamente dal midollo osseo di donatori sani. L'esposizione di queste cellule alle diverse nanoparticelle testate ha dimostrato che l'effetto tossico di diverse nanoparticelle può essere molto diverso, a seconda non solo dalla fonte delle cellule utilizzate, ma anche in relazione alla via differenziativa che queste cellule prendono in risposta a diversi fattori di crescita. Ne consegue, che per capire l'effetto del contatto tra nanoparticelle e sistema biologico *in vivo* sia fondamentale scegliere il sistema biologico *in vitro* più idoneo da utilizzare in

laboratorio. In questo scenario, le linee cellulari immortalizzate sembrano la scelta più lontana dalla necessità di creare un modello *in vitro* su cui basare protocolli standard per la predizione della tossicità di nanomateriali *in vivo*.

E' stato dimostrato che le nanoparticelle inalate possono passare nella circolazione sanguigna entro 1 minuto dall'esposizione (35). Considerato che, prima di questo lavoro, non erano mai stati effettuati studi di citotossicità sui progenitori ematopoietici, che si trovano sia nel sangue che nel midollo osseo, abbiamo ritenuto rilevante la scelta di cellule progenitrici ematopoietiche midollari umane come modello sperimentale. Abbiamo, quindi, testato l'effetto delle 7 nanoparticelle metalliche (Au, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₂O₃, Ag, Co e Sb₂O₃) sulla crescita e differenziamento delle cellule progenitrici ematopoietiche (HPCs) CD34⁺ del midollo osseo umano. I risultati hanno mostrato che le NP di Au, TiO₂, Fe₃O₄, Fe₂O₃ e Ag non hanno effetti tossici alle concentrazioni analizzate, in termini di formazione di colonie eritroidi (rosse) e granulocitiche-monocitiche (bianche). Le NP di Co e Sb₂O₃, invece, hanno manifestato effetti tossici che probabilmente seguono meccanismi separati per i due diversi tipi di NP. Le nanoparticelle di Co, infatti, hanno inibito la formazione sia di colonie rosse che di colonie bianche, in maniera dose-dependent. La tossicità delle NP di Co, inoltre, è consistente con osservazioni su linee cellulari umane (non mostrate) ed è probabilmente dovuta al rilascio di ioni di Co dalle NPs (45).

Le NP di Sb₂O₃, invece, hanno manifestato un effetto tossico molto più specifico. Infatti, la presenza di queste NP non ha avuto nessun tipo di effetto sulla formazione di colonie bianche da parte di progenitori midollari (CFU-GM); al contrario, le NP di Sb₂O₃ hanno inibito totalmente la formazione di colonie rosse, derivanti da progenitori midollari eritroidi (BFU-E). Questo effetto è molto specifico ed altamente consistente: alla concentrazione di 5 ppm, tutti e 9 i campioni che abbiamo testato, provenienti da 9 donatori diversi, hanno dato lo stesso risultato: nessun effetto sui progenitori CFU-GM, contro l'inibizione totale di colonie di origine BFC-E.

Gli esperimenti successivi hanno dimostrato che l'effetto tossico delle nanoparticelle di Sb₂O₃ si manifesta durante il processo di proliferazione delle cellule progenitrici eritroidi, e non durante il differenziamento di questi progenitori. Inoltre, è stata molto sorprendente

L'osservazione al microscopio elettronico, che non ha evidenziato l'attesa inclusione intracellulare delle NP di Sb_2O_3 , ma ha mostrato una interazione a livello della membrana plasmatica. Il meccanismo, per cui il "solo" contatto tra le NP e la membrana plasmatica possa mandare un messaggio di alterazione e morte della cellula, resta da definire ed apre un interessante nuova prospettiva di investigazione sui meccanismi di tossicità delle nanoparticelle.

L'analisi del signaling, analizzando la variazione dell'espressione di alcuni geni 6 ore dopo il trattamento, non ha rivelato alcuna alterazione delle vie di segnalazione delle pathways analizzate. Forse il tempo di trattamento di 6 ore non è stato sufficiente per notare differenze a livello genico di queste vie di signaling. Abbiamo scelto questo time point poiché da osservazione sia al microscopio elettronico che al microscopio ottico, già a 6 ore si notavano alterazioni morfologiche delle cellule; a 24 ore dal trattamento si osservava uno stadio avanzato di morte cellulare.

Siccome le NP che entrano nella circolazione sanguigna hanno un immediato contatto con le proteine del siero, oltre che con le cellule, abbiamo voluto vedere se la particolarità delle NP di Sb_2O_3 , che sono state le uniche a manifestare un effetto tossico specifico sulle cellule del sangue, sia ripetibile anche a livello di interazione con proteine plasmatiche. In effetti, in esperimenti di centrifugazione delle nanoparticelle di TiO_2 , Co e Sb_2O_3 incubate in siero umano, soltanto le NP di Sb_2O_3 hanno legato un numero indefinito di proteine del sangue. I pellet di TiO_2 e Co, al contrario, non contenevano proteine. Questo dato suggerisce che le NP di Sb_2O_3 possano avere una maggiore capacità di legame a molecole proteiche, rispetto ad altre NP.

Infine, il paragone con linee cellulari umane della stessa origine ematopoietica rispetto alle cellule progenitrici del midollo osseo, ha dimostrato che la risposta in termini di tossicità non è riproducibile in linee immortalizzate.

Tutti i dati presentati in questa tesi aiutano a delineare i meccanismi di tossicità delle nanoparticelle, e dovrebbero essere presi in considerazione quando si disegnano protocolli per studi sperimentali *in vitro* sulla tossicità delle nanoparticelle.



BIBLIOGRAFIA

1. **Avakian, M. D., B. Dellinger, H. Fiedler, B. Gullet, C. Koshland, S. Marklund, G. Oberdorster, S. Safe, A. Sarofim, K. R. Smith, D. Schwartz, and W. A. Suk.** 2002. The origin, fate, and health effects of combustion by-products: a research framework. *Environ Health Perspect* **110**:1155-62.
2. **Boland, S., A. Baeza-Squiban, T. Fournier, O. Houcine, M. C. Gendron, M. Chevrier, G. Jouvenot, A. Coste, M. Aubier, and F. Marano.** 1999. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol* **276**:L604-13.
3. **Borm, P. J., and W. Kreyling.** 2004. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol* **4**:521-31.
4. **Borm, P. J., D. Robbins, S. Haubold, T. Kuhlbusch, H. Fissan, K. Donaldson, R. Schins, V. Stone, W. Kreyling, J. Lademann, J. Krutmann, D. Warheit, and E. Oberdorster.** 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol **3**:11.
5. **Bradley, T. R., and D. Metcalf.** 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* **44**:287-99.
6. **Brezova, V., D. Dvoranova, P. Rapt, and A. Stasko.** 2000. Photoinduced electron transfer between C70 fullerene and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine studied by electron paramagnetic resonance. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **56**:2729-39.
7. **Brown, D. M., K. Donaldson, P. J. Borm, R. P. Schins, M. Dehnhardt, P. Gilmour, L. A. Jimenez, and V. Stone.** 2004. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**:L344-53.
8. **Calderon-Garciduenas, L., W. Reed, R. R. Maronpot, C. Henriquez-Roldan, R. Delgado-Chavez, A. Calderon-Garciduenas, I. Dragustinovis, M. Franco-Lira, M. Aragon-Flores, A. C. Solt, M. Altenburg, R. Torres-Jardon, and J. A. Swenberg.** 2004. Brain inflammation and Alzheimer's-like pathology in individuals exposed to severe air pollution. *Toxicol Pathol* **32**:650-8.
9. **Campbell, A., M. Oldham, A. Becaria, S. C. Bondy, D. Meacher, C. Sioutas, C. Misra, L. B. Mendez, and M. Kleinman.** 2005. Particulate matter in polluted air may increase biomarkers of inflammation in mouse brain. *Neurotoxicology* **26**:133-40.
10. **Cyrys, J., M. Stolzel, J. Heinrich, W. G. Kreyling, N. Menzel, K. Wittmaack, T. Tuch, and H. E. Wichmann.** 2003. Elemental composition and sources of fine and ultrafine ambient particles in Erfurt, Germany. *Sci Total Environ* **305**:143-56.
11. **Dellinger, B., W. A. Pryor, R. Cueto, G. L. Squadrito, V. Hegde, and W. A. Deutsch.** 2001. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem Res Toxicol* **14**:1371-7.
12. **Dick, C. A., D. M. Brown, K. Donaldson, and V. Stone.** 2003. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol* **15**:39-52.
13. **Donaldson, K., V. Stone, A. Clouter, L. Renwick, and W. MacNee.** 2001. Ultrafine particles. *Occup Environ Med* **58**:211-6, 199.
14. **Fanning, E. W., J. R. Froines, M. J. Utell, M. Lippmann, G. Oberdorster, M. Frampton, J. Godleski, and T. V. Larson.** 2009. Particulate matter (PM) research centers (1999-2005) and the role of interdisciplinary center-based research. *Environ Health Perspect* **117**:167-74.
15. **Frampton, M. W., J. C. Stewart, G. Oberdorster, P. E. Morrow, D. Chalupa, A. P. Pietropaoli, L. M. Frasier, D. M. Speers, C. Cox, L. S. Huang, and M. J. Utell.** 2006.

- Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. *Environ Health Perspect* **114**:51-8.
16. **Franklin, M., A. Zeka, and J. Schwartz.** 2007. Association between PM_{2.5} and all-cause and specific-cause mortality in 27 US communities. *J Expo Sci Environ Epidemiol* **17**:279-87.
 17. **Gatti, A. M., D. Tossini, A. Gambarelli, S. Montanari, and F. Capitani.** 2009. Investigation of the presence of inorganic micro- and nanosized contaminants in bread and biscuits by environmental scanning electron microscopy. *Crit Rev Food Sci Nutr* **49**:275-82.
 18. **Giarratana, M. C., L. Kobari, H. Lapillonne, D. Chalmers, L. Kiger, T. Cynober, M. C. Marden, H. Wajcman, and L. Douay.** 2005. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* **23**:69-74.
 19. **Greim, H., P. Borm, R. Schins, K. Donaldson, K. Driscoll, A. Hartwig, E. Kuempel, G. Oberdorster, and G. Speit.** 2001. Toxicity of fibers and particles. Report of the workshop held in Munich, Germany, 26-27 October 2000. *Inhal Toxicol* **13**:737-54.
 20. **Jendelova, P., V. Herynek, L. Urdzikova, K. Glogarova, J. Kroupova, B. Andersson, V. Bryja, M. Burian, M. Hajek, and E. Sykova.** 2004. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res* **76**:232-43.
 21. **Kawasaki, S., H. Takizawa, K. Takami, M. Desaki, H. Okazaki, T. Kasama, K. Kobayashi, K. Yamamoto, K. Nakahara, M. Tanaka, M. Sagai, and T. Ohtoshi.** 2001. Benzene-extracted components are important for the major activity of diesel exhaust particles: effect on interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**:419-26.
 22. **Kedar, N. P.** 2003. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *J Postgrad Med* **49**:236-45.
 23. **Knaapen, A. M., T. Shi, P. J. Borm, and R. P. Schins.** 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol Cell Biochem* **234-235**:317-26.
 24. **Kreuter, J.** 2004. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol* **4**:484-8.
 25. **Kreyling, W. G., M. Semmler-Behnke, J. Seitz, W. Scymczak, A. Wenk, P. Mayer, S. Takenaka, and G. Oberdorster.** 2009. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol* **21**:55-60.
 26. **Kreyling, W. G., M. Semmler, F. Erbe, P. Mayer, S. Takenaka, H. Schulz, G. Oberdorster, and A. Ziesenis.** 2002. Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. *J Toxicol Environ Health A* **65**:1513-30.
 27. **Lighty, J. S., J. M. Veranth, and A. F. Sarofim.** 2000. Combustion aerosols: factors governing their size and composition and implications to human health. *J Air Waste Manag Assoc* **50**:1565-618; discussion 1619-22.
 28. **Lockman, P. R., J. M. Koziara, R. J. Mumper, and D. D. Allen.** 2004. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J Drug Target* **12**:635-41.
 29. **Mantovani, I., A. Cappellini, P. L. Tazzari, V. Papa, L. Cocco, and A. M. Martelli.** 2006. Caspase-dependent cleavage of 170-kDa P-glycoprotein during apoptosis of human T-lymphoblastoid CEM cells. *J Cell Physiol* **207**:836-44.
 30. **Migliaccio, G., R. Di Pietro, V. di Giacomo, A. Di Baldassarre, A. R. Migliaccio, L. Maccioni, R. Galanello, and T. Papayannopoulou.** 2002. In vitro mass production of human erythroid

- cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients. *Blood Cells Mol Dis* **28**:169-80.
31. **Miller, K. A., D. S. Siscovick, L. Sheppard, K. Shepherd, J. H. Sullivan, G. L. Anderson, and J. D. Kaufman.** 2007. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *N Engl J Med* **356**:447-58.
 32. **Mills, N. L., K. Donaldson, P. W. Hadoke, N. A. Boon, W. MacNee, F. R. Cassee, T. Sandstrom, A. Blomberg, and D. E. Newby.** 2009. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **6**:36-44.
 33. **Muller, R. H., and C. M. Keck.** 2004. Drug delivery to the brain--realization by novel drug carriers. *J Nanosci Nanotechnol* **4**:471-83.
 34. **Murdock, R. C., L. Braydich-Stolle, A. M. Schrand, J. J. Schlager, and S. M. Hussain.** 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicol Sci* **101**:239-53.
 35. **Nemmar, A., P. H. Hoet, B. Vanquickenborne, D. Dinsdale, M. Thomeer, M. F. Hoylaerts, H. Vanbilloen, L. Mortelmans, and B. Nemery.** 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* **105**:411-4.
 36. **Nemmar, A., K. Melghit, and B. H. Ali.** 2008. The acute proinflammatory and prothrombotic effects of pulmonary exposure to rutile TiO₂ nanorods in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**:610-9.
 37. **Neumann, H. G.** 2001. Health risk of combustion products: toxicological considerations. *Chemosphere* **42**:473-9.
 38. **Nissen-Druey, C., A. Tichelli, and S. Meyer-Monard.** 2005. Human hematopoietic colonies in health and disease. *Acta Haematol* **113**:5-96.
 39. **Oberdorster, G., J. N. Finkelstein, C. Johnston, R. Gelein, C. Cox, R. Baggs, and A. C. Elder.** 2000. Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. *Res Rep Health Eff Inst*:5-74; disc 75-86.
 40. **Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster.** 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* **113**:823-39.
 41. **Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling, and C. Cox.** 2004. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* **16**:437-45.
 42. **Oberdorster, G., Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, A. Lunts, W. Kreyling, and C. Cox.** 2002. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* **65**:1531-43.
 43. **Peters, A., D. W. Dockery, J. E. Muller, and M. A. Mittleman.** 2001. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* **103**:2810-5.
 44. **Peters, A., S. von Klot, M. Heier, I. Trentinaglia, A. Hormann, H. E. Wichmann, and H. Lowel.** 2004. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N Engl J Med* **351**:1721-30.
 45. **Peters, K., R. E. Unger, A. M. Gatti, E. Sabbioni, R. Tsaryk, and C. J. Kirkpatrick.** 2007. Metallic nanoparticles exhibit paradoxical effects on oxidative stress and pro-inflammatory response in endothelial cells in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol* **20**:685-95.
 46. **Pluznik, D. H., and L. Sachs.** 1965. The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* **66**:319-24.
 47. **Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, K. Ito, and G. D. Thurston.** 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama* **287**:1132-41.
 48. **Pope, C. A., 3rd, R. T. Burnett, G. D. Thurston, M. J. Thun, E. E. Calle, D. Krewski, and J. J. Godleski.** 2004. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air

- pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation* **109**:71-7.
49. **Ruckerl, R., A. Ibal-Mulli, W. Koenig, A. Schneider, G. Woelke, J. Cyrus, J. Heinrich, V. Marder, M. Frampton, H. E. Wichmann, and A. Peters.** 2006. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. *Am J Respir Crit Care Med* **173**:432-41.
 50. **Schins, R. P., A. M. Knaapen, G. D. Cakmak, T. Shi, C. Weishaupt, and P. J. Borm.** 2002. Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells. *Mutat Res* **517**:77-86.
 51. **Semmler, M., J. Seitz, F. Erbe, P. Mayer, J. Heyder, G. Oberdorster, and W. G. Kreyling.** 2004. Long-term clearance kinetics of inhaled ultrafine insoluble iridium particles from the rat lung, including transient translocation into secondary organs. *Inhal Toxicol* **16**:453-9.
 52. **Singh, N.** 2009. Conference scene - nanotoxicology: health and environmental impacts. *Nanomed* **4**:385-90.
 53. **Squadrito, G. L., R. Cueto, B. Dellinger, and W. A. Pryor.** 2001. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med* **31**:1132-8.
 54. **Stone, V., G. D. Johnson, J. C. Wilton, R. Coleman, and J. K. Chipman.** 1994. Effect of oxidative stress and disruption of Ca²⁺ homeostasis on hepatocyte canalicular function in vitro. *Biochem Pharmacol* **47**:625-32.
 55. **Utell, M. J., and M. W. Frampton.** 2000. Acute health effects of ambient air pollution: the ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med* **13**:355-59.
 56. **Vallyathan, V., J. F. Mega, X. Shi, and N. S. Dalal.** 1992. Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**:404-13.
 57. **Yamakoshi, Y., N. Umezawa, A. Ryu, K. Arakane, N. Miyata, Y. Goda, T. Masumizu, and T. Nagano.** 2003. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O₂-* versus 1O₂. *J Am Chem Soc* **125**:12803-9.
 58. **Yavuz, C. T., J. T. Mayo, W. W. Yu, A. Prakash, J. C. Falkner, S. Yean, L. Cong, H. J. Shipley, A. Kan, M. Tomson, D. Natelson, and V. L. Colvin.** 2006. Low-field magnetic separation of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals. *Science* **314**:964-7.
 59. **Zanobetti, A., and J. Schwartz.** 2005. The effect of particulate air pollution on emergency admissions for myocardial infarction: a multicity case-crossover analysis. *Environ Health Perspect* **113**:978-82.
 60. **Zeka, A., A. Zanobetti, and J. Schwartz.** 2006. Individual-level modifiers of the effects of particulate matter on daily mortality. *Am J Epidemiol* **163**:849-59.
 61. **Zeka, A., A. Zanobetti, and J. Schwartz.** 2005. Short term effects of particulate matter on cause specific mortality: effects of lags and modification by city characteristics. *Occup Environ Med* **62**:718-25.